

**PCT**ORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE  
Bureau international

DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

<b>(51) Classification internationale des brevets <sup>6</sup> :</b> <b>C12N 15/10, C12Q 1/68, C07H 21/00</b>	<b>A1</b>	<b>(11) Numéro de publication internationale: WO 98/05766</b> <b>(43) Date de publication internationale: 12 février 1998 (12.02.98)</b>
<b>(21) Numéro de la demande internationale:</b> PCT/FR97/01445 <b>(22) Date de dépôt international:</b> 1er août 1997 (01.08.97) <b>(30) Données relatives à la priorité:</b> 96/09977 2 août 1996 (02.08.96) FR <b>(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US):</b> BIO MERIEUX [FR/FR]; Chemin de l'Orme, F-69280 Marcy l'Etoile (FR). <b>(72) Inventeurs; et</b> <b>(75) Inventeurs/Déposants (US seulement):</b> GUILLOU-BONNICI, Françoise [FR/FR]; 14, rue Dedieu, F-69100 Villeurbanne (FR). DEFRANC, Eric [FR/FR]; Grande Rue, F-38570 Goncelin (FR). HOANG, Antoine [FR/FR]; 18, rue Gaston Monmousseau, F-69200 Venissieux (FR). LAAYOUN, Ali [FR/FR]; 1, rue du Rhône, F-69007 Lyon (FR). LHOMME, Jean [FR/FR]; 13, rue des Brandons, F-38240 Meylan (FR). TREVISIOL, Emmanuelle [FR/FR]; 15, boulevard du Maréchal Joffre, F-38000 Grenoble (FR). <b>(74) Mandataire:</b> CABINET GERMAIN & MAUREAU; Boîte postale 6153, F-69466 Lyon Cedex 06 (FR).		<b>(81) Etats désignés:</b> CA, JP, US, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).  <b>Publiée</b> <i>Avec rapport de recherche internationale.</i>
<b>(54) Title:</b> TARGET NUCLEIC ACID SEQUENCE AMPLIFICATION METHOD <b>(54) Titre:</b> PROCEDE D'AMPLIFICATION D'UNE SEQUENCE D'UN ACIDE NUCLEIQUE CIBLE <b>(57) Abstract</b> <p>A target nucleic acid sequence amplification method wherein at least the target nucleic acid sequence, at least one oligonucleotide primer specific for the target sequence, one or more enzymatic activities and nucleotides are provided, and the target sequence is amplified under conditions suitable in particular for said enzymatic activity or activities, is disclosed. According to the method, at least one of the nucleotides is a prefunctionalised nucleotide that differs from the other nucleotides at least in that it includes at least one unprotected reactive covalence function in at least one predetermined site of the base of said nucleotide, in order to give a prefunctionalised amplification product including at least one such prefunctionalised nucleotide. Nucleotides for carrying out the method are also disclosed.</p> <b>(57) Abrégé</b> <p>L'invention concerne un procédé d'amplification d'une séquence d'un acide nucléique cible, selon lequel: on dispose au moins: de la séquence d'un acide nucléique cible, d'au moins une amorce oligonucléotidique spécifique de la séquence cible, d'une ou plusieurs activités enzymatiques, de nucléotides; on amplifie, dans des conditions adaptées notamment à l'activité ou les activités enzymatiques, la séquence cible, selon lequel au moins un des nucléotides est un nucléotide préfonctionnalisé, différent des autres nucléotides au moins par la présence d'au moins une fonction réactive de covalence, non protégée, disposée en au moins un site prédéterminé de la base dudit nucléotide, pour obtenir un produit d'amplification préfonctionnalisé comprenant au moins un tel nucléotide préfonctionnalisé. L'invention concerne aussi des nucléotides pour mettre en oeuvre ce procédé.</p>		

# **UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION**

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave de Macédoine	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	ML	Mali	TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	MN	Mongolie	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MR	Mauritanie	UA	Ukraine
BR	B Brésil	IL	Israël	MW	Malawi	UG	Ouganda
BY	Bélarus	IS	Islande	MX	Mexique	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	NE	Niger	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NL	Pays-Bas	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Norvège	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NZ	Nouvelle-Zélande	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	PL	Pologne		
CM	Cameroun	KR	République de Corée	PT	Portugal		
CN	Chine	KZ	Kazakhstan	RO	Roumanie		
CU	Cuba	LC	Sainte-Lucie	RU	Fédération de Russie		
CZ	République tchèque	LI	Liechtenstein	SD	Soudan		
DE	Allemagne	LK	Sri Lanka	SE	Suède		
DK	Danemark	LR	Libéria	SG	Singapour		
EE	Estonie						

**Procédé d'amplification d'une séquence d'un acide nucléique  
cible**

La présente invention concerne un procédé d'amplification d'une séquence d'un acide nucléique cible.

5           On connaît selon le document EP-A-0 285 057, un procédé de traitement d'un nucléotide consistant à introduire sur l'un des éléments constitutifs dudit nucléotide, à savoir le sucre, la base purique ou pyrimidique, et les groupements phosphate, un groupement fonctionnel ayant diverses utilisations  
10 et notamment celles de marquage. Le nucléotide ainsi traité obtenu pourrait être incorporé dans un polynucléotide, notamment sous la forme double-brin sans que la double hélice ne soit déstabilisée par la présence de ce nucléotide.

Toutefois dans ce cas, les groupements fonctionnels  
15 fixés sur le nucléotide selon cet art antérieur présentent différents phénomènes tels que par exemple l'encombrement stérique, des interactions hydrophobes ou des phénomènes de complexation, qui empêchent la reconnaissance du polynucléotide ayant incorporé ledit nucléotide traité, par la plupart des  
20 enzymes, qui reconnaîtraient le polynucléotide correspondant, dans lequel ledit nucléotide traité n'a pas été incorporé.

Conformément à la présente invention, on apporte un procédé d'amplification qui pallie les inconvénients précédemment cités et qui notamment ne perturbe pas  
25 l'incorporation des nucléotides et en conséquence n'influence pas de manière significative le rendement et/ou la sensibilité dans une réaction d'amplification de cible et qui de plus permet d'obtenir un excellent marquage des produits d'amplification en évitant des phénomènes d'instabilité du marqueur liés à une  
30 incorporation préalable de ce dernier.

Ainsi, la présente invention a pour objet un procédé d'amplification d'une séquence d'un acide nucléique cible, selon lequel :

- on dispose au moins : de la séquence d'un acide  
35 nucléique cible, d'au moins une amorce oligonucléotidique

spécifique de la séquence cible, d'une ou plusieurs activités enzymatiques, de nucléotides,

- on amplifie, dans des conditions adaptées notamment à l'activité ou les activités enzymatiques, la séquence cible, 5  
procédé selon lequel au moins un des nucléotides est un nucléotide préfonctionnalisé, différant des autres nucléotides au moins par la présence d'au moins une fonction réactive de covalence, non protégée, disposée en au moins un site prédéterminé de la base dudit nucléotide, pour obtenir un 10  
produit d'amplification préfonctionnalisé comprenant au moins un dit nucléotide préfonctionnalisé.

Selon un procédé avantageux de l'invention il comprend en outre les étapes suivantes :

- on dispose d'un réactif comprenant une fonction 15  
anti-réactive de covalence, spécifique de la fonction réactive du nucléotide préfonctionnalisé, et un groupement fonctionnel, et

- on fait réagir, directement ou indirectement, le produit d'amplification préfonctionnalisé, avec le réactif, pour 20  
obtenir un produit d'amplification fonctionnalisé.

Avant d'exposer l'invention de manière détaillée, certains termes employés dans la présente description sont ci-après définis.

Par nucléotide selon l'invention, on entend un 25  
monomère nucléotidique naturel ou modifié tel que défini ci-dessous.

Ainsi, le monomère nucléotidique peut être un nucléotide naturel d'acide nucléique dont les éléments constitutifs sont un sucre, un groupement phosphate et une base 30  
azotée; dans l'ARN le sucre est le ribose, dans l'ADN le sucre est le 2'-désoxy-ribose; selon qu'il s'agit de l'ADN ou l'ARN, la base azotée est choisie parmi l'adénine, la guanine, l'uracile, la cytosine, la thymine; ou un nucléotide modifié dans l'un au moins des trois éléments constitutifs ; à titre 35  
d'exemple, la modification peut intervenir au niveau des bases, générant des produits modifiés telles que l'inosine, la méthyl-

5-désoxycytidine, la désoxyuridine, la diméthylamino-5-désoxyuridine, la diamino-2,6-purine, la bromo-5-désoxyuridine et toute autre base modifiée permettant l'hybridation, au niveau du sucre, à savoir par exemple le remplacement d'au moins un  
5 désoxyribose par un analogue (exemple: P.E. Nielsen et al, Science, 254, 1497-1500 (1991)), au niveau du groupement phosphate par exemple des dérivés boronates, alkylphosphonates ou phosphorothioates.

Par groupement protecteur, on entend les groupements  
10 utilisés de manière classique dans la synthèse chimique de nucléosides, nucléotides et oligonucléotides (voir par exemple: Chemistry of Nucleosides and Nucleotides, Edited by Leroy B. Townsend, Plenum Press, New York and London et Protocols for Oligonucleotides and Analogs, Synthesis and Properties, Edited  
15 by Sudhir Agrawal, Humana Press, Totowa, New Jersey).

Un groupe fonctionnel de marquage de l'invention est une molécule susceptible de générer directement ou indirectement un signal détectable. Il est notamment choisi parmi les isotopes radioactifs, des enzymes notamment choisies parmi la peroxydase,  
20 la phosphatase alcaline, la  $\beta$ -galactosidase, et celles susceptibles d'hydrolyser un substrat chromogène, fluorigène ou luminescent, des composés chimiques chromophores, chromogènes, fluorophores, fluorigènes ou luminescents, des analogues de bases nucléotidiques, et des ligands tels que la biotine.

25 Dans le cas où le marqueur ne peut générer directement un signal, par exemple, quand celui-ci est une enzyme, il est nécessaire d'ajouter un révélateur, par exemple un substrat correspondant à l'enzyme, la réaction enzyme/substrat générant un complexe détectable, par exemple un composé chromogène ou  
30 luminescent. A titre d'exemple, le réactif révélateur peut être l'ortho-phénylène-diamine, la 4-méthyl-umbelliféryl-phosphate.

La fonction réactive de covalence du nucléotide préfonctionnalisé et la fonction anti-réactive du réactif, sont respectivement des fonctions chimiques organiques électrophiles  
35 et nucléophiles, ou inversement.

La fonction chimique organique électrophile est avantageusement choisie parmi les fonctions aldéhyde, ester activé, acide carboxylique, isothiocyanate, dérivés haloacyles et chlorure de sulfonyle.

5 La fonction chimique organique nucléophile est avantageusement choisie parmi les fonctions amine, thiol, oxyamine, hydrazine et hydrazide, de préférence c'est la fonction alkoxyamine.

10 Selon une variante de l'invention, la fonction réactive de covalence du nucléotide modifié est greffée sur la base par l'intermédiaire d'un bras de couplage et/ou la fonction anti-réactive de covalence du réactif est greffée sur le groupement fonctionnel par l'intermédiaire d'un bras de couplage.

15 Le bras de couplage est notamment choisi parmi les chaînes hydrocarbonées, saturées ou insaturées, éventuellement interrompues par des fonctions amine, amide et oxy.

Selon un procédé préférentiel, la fonction réactive de covalence est la fonction oxyamine, la fonction anti-réactive de covalence du réactif est la fonction aldéhyde, et cette dernière est liée à un groupement fonctionnel de marquage tel qu'un groupement fluorescent ou luminescent.

20 Avantageusement la fonction aldéhyde est liée au groupement fonctionnel par le bras de couplage  $\text{-NH-CS-NH-(CH}_2\text{)}_3\text{-}$  et le groupement fonctionnel du réactif est la fluorescéine.

25 Le produit nucléotidique préfonctionnalisé peut comprendre une ou plusieurs fonctions réactives de covalence, identiques ou différentes, introduites par un ou plusieurs nucléotides. Lesdites fonctions réactives de covalence peuvent réagir avec un ou plusieurs réactifs, identiques ou différents, de manière simultanée ou séquentielle. La détection des groupements fonctionnels de marquage du produit fonctionnalisé peut être simultanée ou séquentielle.

30 Il est entendu que ce procédé de marquage peut être appliqué à un ou plusieurs produits nucléotidiques

préfonctionnalisés, notamment pour différencier des produits préfonctionnalisés issus de cibles différentes.

Le produit d'amplification fonctionnalisé marqué peut être détecté qualitativement et/ou quantitativement en phase  
5 homogène ou hétérogène.

En phase homogène, le réactif et le produit nucléotidique préfonctionnalisé interagissent dans le même milieu liquide. En phase hétérogène, le produit préfonctionnalisé peut être traité avec le réactif avant ou  
10 après capture sur un support solide, c'est à dire directement ou indirectement. La capture sur le support solide peut être réalisée par des moyens connus, tels que l'adsorption, la covalence, notamment en utilisant des fonctions anti-réactives de covalence disponibles à la surface du support solide ou par  
15 hybridation avec un composé polynucléotidique.

Le support solide, sous toutes formes appropriées telles que tube, cône, puits, plaque de microtitration, feuille, puce ou polymère soluble, est choisi parmi les polystyrènes, les copolymères styrène-butadiène, les copolymères styrène-butadiène  
20 en mélange avec des polystyrènes, des polypropylènes, des polycarbonates, des copolymères polystyrène-acrylonitrile, des copolymères styrène-méthylméthacrylate de méthyle, parmi les fibres synthétiques et naturelles, parmi les polysaccharides et les dérivés de la cellulose, le verre, le silicium et leurs  
25 dérivés.

Selon des variantes préférentielles du procédé de l'invention,

- la séquence d'acide nucléique cible est une séquence d'ADN ou d'ARN, et les activités enzymatiques comprennent les  
30 activités ADN polymérase ARN- et/ou ADN-dépendantes,

- les activités enzymatiques peuvent en outre comprendre l'activité ribonucléase H et l'activité ARN polymérase ADN-dépendante, pour amplifier la séquence d'acide nucléique cible selon une suite de réactions de transcription  
35 inverse, de transcription et de digestion.

Les activités enzymatiques ribonucléase H et ADN polymérase peuvent être apportées par une seule enzyme ou bien chacune par une enzyme différente.

A titre d'exemple, le procédé de l'invention peut être  
5 utilisé pour l'amplification d'un acide nucléique cible dans un échantillon selon des techniques bien connues de l'homme de l'art, telles que la PCR (Polymerase Chain Reaction), la RT-PCR (Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction), la TMA (Transcription Mediated Amplification) ou la technique NASBA  
10 (Nucleic Acid Sequence Based Amplification), ou toute autre technique d'amplification enzymatique.

L'invention concerne également un analogue de nucléotide ou un nucléotide, préfonctionnalisé, susceptible d'être soumis à un traitement enzymatique.

15 Par traitement enzymatique d'un analogue de nucléotide ou d'un nucléotide, on inclut toutes les réactions, *in vivo* ou *in vitro*, au cours desquelles intervient au moins une enzyme dont l'activité est liée à un nucléotide. Ainsi on comprend toutes réactions comprenant au moins une étape enzymatique dans  
20 laquelle un nucléotide sert de substrat à l'enzyme, que ledit nucléotide soit transformé ou non au cours de cette étape enzymatique ; à titre d'exemple de telles réactions sont choisies parmi celles utilisées dans les techniques de biologie moléculaire telles que la transcription, la ligation,  
25 l'élongation, la coupure, et plus particulièrement dans les techniques d'amplification, (WINN-DEEN, Journal of Clinical Assay, vol 19, p21-26 (1996)).

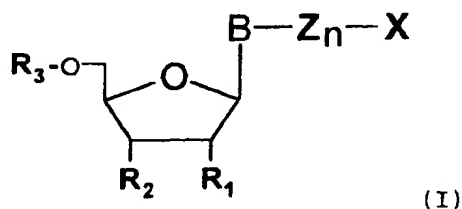
Ainsi les enzymes dont les activités sont liées à des nucléotides peuvent en particulier être sélectionnées dans la  
30 liste non exhaustive suivante : les ADN polymérases ADN dépendantes telles que le fragment de Klenow de l'ADN polymérase I de *E. coli*, la Taq polymérase, les T7, T4 ou T5 ADN polymérases, les polymérases eucaryotes cellulaires ou virales a, b, g ; les ADN polymérases ARN dépendantes telles que les  
35 polymérases de AMV (Avian Myoblastosis Virus), de MMLV (Moloney Murine Leukemia Virus) ; les ARN polymérases telles que les T7,



T3, SP6, N4, PBSII ARN polymérases, l'ARN polymérase de *E. coli* ; les enzymes à activité nucléasique telles que les endonucléases de restriction, la RNase H ; ou encore les polyA polymérases, les répliques, telle que la Q-béta-réplique, les  
 5 terminal transférases, ou les ligases.

Selon un mode préféré, on choisira pour l'application du procédé de l'invention la technique TMA pour l'amplification d'une séquence d'acide nucléique cible ARN ou l'amplification d'une séquence d'acide nucléique cible ADN après une étape de  
 10 transcription inverse, ladite technique étant décrite dans la demande internationale WO 91/01384 incorporée à titre de référence.

Un analogue de nucléotide, préfonctionnalisé selon l'invention répond à la formule générale (I)  
 15



dans laquelle  
 20 B représente une base nucléique,  
 Z représente un bras de couplage,  
 n est un entier égal à 0 ou 1,  
 X représente une fonction réactive de covalence fixée  
 sur au moins un site de la base nucléique B,  
 25 R<sup>1</sup> représente H ou OH,  
 R<sup>2</sup> représente H, OH, un groupement mono- di- ou tri-  
 phosphate, ou un groupement O-R dans lequel R représente un  
 groupement protecteur,  
 R<sup>3</sup> représente H, un groupement protecteur, ou un  
 30 groupement mono-, di- ou tri-phosphate.

De préférence,  $R^1$  et  $R^2$  représentent chacun indépendamment l'un de l'autre H, OH et  $R^3$  représente un groupement mono-, di- ou tri-phosphate.

Un nucléotide préfonctionnalisé de l'invention est  
5 choisi parmi les nucléotides suivants :

- un nucléotide dont la base nucléique est dérivée de la cytosine et comporte, au moins sur la fonction aminée en position 4 du cycle pyrimidique, au moins une fonction réactive de covalence nucléophile, non protégée, et n'influençant pas, de  
10 manière significative, le traitement enzymatique dudit nucléotide, la fonction réactive de covalence étant choisie parmi les fonctions  $NH_2$ ,  $O-NH_2$ , SH, hydrazine et hydrazide et la fonction réactive de covalence est liée à ladite fonction aminée en position 4 du cycle pyrimidique par un bras de couplage  
15 choisi parmi  $(-CH_2-)_n$ ,  $(-O-CH_2-)_n$  dans lequel  $n_1$  est un entier compris entre 1 et 12 ;  $(-CH_2-O-CH_2-)_n$ ,  $(-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-)_n$ ,  $(-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-)_n$ ,  $(-CH_2-O-CH_2-CH_2-)_n$ , dans lequel  $n_2$  est un entier compris entre 1 et 6 ; et  $-NH-CH_2-O-CH_2-CH_2$ . Avantageusement, la fonction réactive de covalence  
20 est liée à ladite fonction aminée par l'intermédiaire d'un bras de couplage choisi parmi  $-CH_2-$ ,  $-CH_2-CH_2-$ ,  $-CH_2-CH_2-CH_2-$ ,  $-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-$ ,  $-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-$ ,  $-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-$ ,  $-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-$ , et  $NH-CH_2-O-CH_2-CH_2$ .

- un nucléotide dont la base est dérivée de l'uracile  
25 et comporte au moins sur la position 5 du cycle pyrimidique, au moins une fonction réactive de covalence nucléophile, non protégée, et n'influençant pas, de manière significative, le traitement enzymatique, caractérisé en ce que la fonction réactive de covalence est choisie parmi les fonctions  $NH_2$ ,  $O-$   
30  $NH_2$ , SH, hydrazine et hydrazide; avantageusement, la fonction réactive de covalence est liée à ladite fonction aminée par l'intermédiaire d'un bras de couplage choisi parmi  $C\equiv C-CH_2-$ , et  $-C\equiv C-CH_2-NH-CO-CH_2-$ ,  $-CH=CH-CH_2-NH-CO-CH_2-$  et  $-CH=CH-CH_2-$ ;

- un nucléotide dont la base est dérivée de l'adénine  
35 et comporte au moins sur la fonction aminée en position 6 du cycle pyrimidique, au moins une fonction réactive de covalence

nucléophile, non protégée, et n'influençant pas, de manière significative, le traitement enzymatique, caractérisé en ce que la fonction réactive de covalence est choisie parmi les fonctions  $\text{NH}_2$ ,  $\text{CH}_2\text{-O-NH}_2$ ,  $\text{SH}$ , hydrazine et hydrazide ; la

5 fonction réactive de covalence est liée à ladite fonction aminée par l'intermédiaire d'un bras de couplage choisi parmi  $(\text{-CH}_2\text{-})_{n_1}$ ,  $(\text{-O-CH}_2\text{-})_{n_1}$  dans lequel  $n_1$  représente un entier compris entre 1 et 12 ;  $(\text{-CH}_2\text{-O-CH}_2\text{-})_{n_2}$ ,  $(\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-O-CH}_2\text{-CH}_2\text{-})_{n_2}$ ,  $(\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-O-CH}_2\text{-CH}_2\text{-O-CH}_2\text{-CH}_2\text{-})_{n_2}$ ,  $(\text{-CH}_2\text{-O-CH}_2\text{-CH}_2\text{-})_{n_2}$ , dans lequel  $n_2$

10 est un entier compris entre 1 et 6 ; et  $\text{NH-CH}_2\text{-O-CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$ .

Avantageusement, la fonction réactive de covalence est liée à ladite fonction aminée par l'intermédiaire d'un bras de couplage choisi parmi  $\text{-CH}_2\text{-}$ ,  $\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$ ,  $\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$ ,  $\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$ ,  $\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$ ,  $\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-O-CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$ ,  $\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-O-CH}_2\text{-CH}_2\text{-O-CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$ , et  $\text{NH-CH}_2\text{-O-CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$  ; et de manière préférée le bras de couplage est  $\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$ .

L'invention concerne aussi l'utilisation d'un nucléotide préfonctionnalisé tel que défini précédemment, dans un traitement enzymatique d'amplification.

20 L'analogue de nucléotide ou le nucléotide, préfonctionnalisé, a, vis-à-vis du traitement enzymatique, un comportement sensiblement identique à celui de l'analogue de nucléotide ou le nucléotide correspondant. En effet, la fonction introduite en un site de la base dudit analogue ou nucléotide,

25 grâce à son inertie biologique et chimique vis-à-vis des enzymes, ne modifie pas significativement ni l'affinité, ni la spécificité de l'enzyme à l'égard de son substrat.

Enfin les derniers objets de l'invention consistent en des utilisations particulières de nucléotides tels qu'ils

30 viennent d'être définis. De manière préférentielle, ils sont utilisés dans des techniques d'amplification, telles que celles décrites dans les documents suivants : EP-0 721 988, WO-95/03426, US-5 409 818, US-5 399 491.

L'invention est maintenant décrite plus en détail par référence aux exemples et figures annexés qui vont suivre et dans lesquels:

La figure 1 représente un schéma général de synthèse  
5 de nucléotides cytidines portant un bras aminé en position 4;

La figure 2 représente un schéma de synthèse du nucléotide cytidine portant un bras alkyloxyaminé en position 4;

La figure 3 représente un schéma de synthèse par transamination de nucléotides; et

10 La figure 4 met en évidence l'effet de l'incorporation de la CTP-(N4)-C<sub>6</sub>O<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub> (27a) sur la sensibilité de la TMA;

La figure 5 met en évidence l'effet de l'incorporation de la CTP-(N4)-C<sub>4</sub>-NH<sub>2</sub> (27b) sur la sensibilité de la TMA.

15 Dans les figures 4 à 5 précitées sont représentés en abscisse le nombre de copies de la cible par réaction et en ordonnée le nombre d'amplicons obtenus par microlitre de réaction (volume final réactionnel= 100 microlitres). Aux courbes des figures 4 et 5 sont affectés des symboles  
20 particuliers, par exemple ■, □, ▲, △, ●, et un pourcentage. Ce pourcentage correspond au pourcentage du ou des nucléotides préfonctionnalisés par rapport aux nucléotides naturels dans la réaction d'amplification TMA. Les figures 4 et 5 montrent respectivement les résultats de la semi-quantification par la  
25 technique ELOSA (décrite dans la demande de brevet PCT WO 92/19812) du nombre d'amplicons produits à partir d'une gamme cible d'ARN 16S de *Mycobacterium tuberculosis* en présence de différents rapports des nucléotides 27a et 27b par rapport à leurs nucléotides naturels respectifs.

30

Dans les exemples qui suivent et qui permettent d'illustrer quelques avantages de l'invention, il est fait référence à un réactif comprenant un groupe fonctionnel de marquage mais la portée de l'invention n'est bien entendu pas  
35 limitée à de telles propriétés du groupe fonctionnel.

**SYNTHESE DE NUCLEOTIDES ET MARQUEURS PREFONCTIONNALISES.**

Pour préfonctionnaliser les nucléotides sur la base  
5 nucléique, la stratégie généralement utilisée consiste en la  
synthèse des nucléosides protégés portant une fonction réactive  
également protégée. La déprotection de la fonction hydroxyle en  
position 5' libère le nucléoside modifié, lequel est finalement  
triphosphorylé sur cette position selon la méthode de Ludwig-  
10 Eckstein (J. Ludwig, F. Eckstein, *J. Org. Chem.*, 1989, 54, 631-  
635).

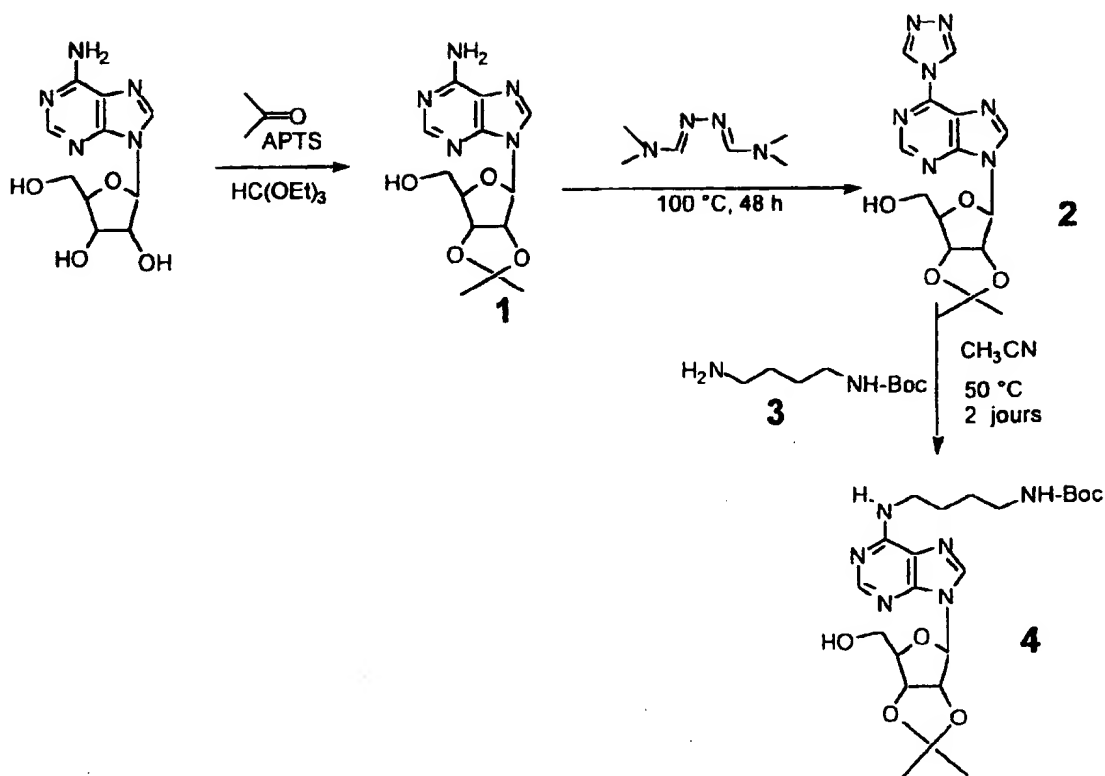
L'hydrolyse des groupements protecteurs des fonctions  
hydroxyles en 2' et 3' et de celui de la fonction réactive de la  
chaîne introduite sur la base, conduit aux nucléotides  
15 triphosphates préfonctionnalisés.

**I- Série adénosine:****EXEMPLE 1 : Synthèse du nucléoside à chaîne amine 4.**

20

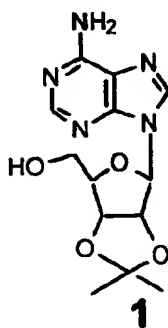
**Voie de synthèse :**

12



Protection et fonctionnalisation de l'adénosine :

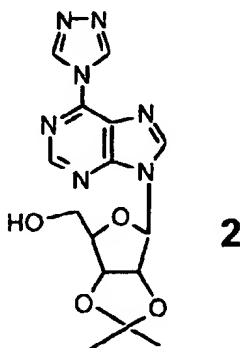
Isopropylidène (1) : (Nucleic Acid Chemistry, part 2, Townsend,  
5 Tipson, p. 768, Wiley Interscience)



A une suspension d'adénosine (5g, 18,7 mmol, Aldrich  
14659-5) dans de l'acétone (10 ml) contenant de l'APTS (3,9 g,  
10 20,6 mmol), on ajoute goutte à goutte sous argon de

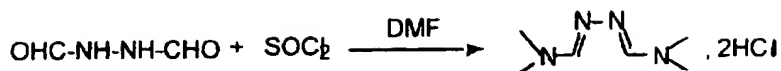
l'orthoformate d'éthyle (12,44 ml, 74,8 mmol). Après une nuit de réaction, on ajoute 110 ml d'eau contenant 1,86 ml d'ammoniaque à 27 %. Après 30 minutes d'agitation, le milieu réactionnel est évaporé jusqu'à apparition de cristaux blancs. Après 12 h au  
5 frigo, on obtient un précipité blanc que l'on recristallise dans l'eau. On obtient 4,175 g (13,5 mmol, 72 %) de produit (1) sous forme d'un poudre blanche. Ce produit a été caractérisé par RMN du proton.

- 10 Triazolo (2) : (Samano, Miles, Robins, *J. Am. Chem. Soc.*, 1994, 116, 9331-9332)



- L'adénosine-isopropylidène (1) (1g, 3,2 mmol) et  
15 l'amidine (1,4 g, 6,5 mmol) sont agitées dans de la pyridine (15 ml) à 100°C sous argon pendant 48 h. La pyridine est alors évaporée et co-évaporée avec du toluène. L'huile obtenue est ensuite reprise par de l'acétate d'éthyle et cette phase organique est lavée avec de l'eau saturée en NaCl. Après séchage  
20 sur Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> et évaporation, on obtient le produit (2) sous forme d'une poudre blanche avec un rendement de 60 % (700 mg, 1,9 mmol). Le produit 2 a été caractérisé par spectrométrie de masse et RMN du proton.

- 25 Synthèse de l'amidine: (Bartlett et Humphreg, *J. Chem. Soc.*, 1967, 1664-1666)



Le chlorure de thionyle (39,96 g, 24,5 ml, 0,338 mol) est ajouté goutte à goutte au N-N'-diformylhydrazine (12 g, 0,136 mol) dans le DMF (270 ml) à 10°C. Le mélange devient  
 5 jaune. On maintient l'agitation pendant 2 jours. Le précipité obtenu est filtré et lavé par du DMF puis par de l'éther. Après séchage sous vide, on obtient l'amidine avec un rendement de 95 % (28 g, 0,130 mol).

10

#### Substitution du triazolo par le diaminobutane monoprotégé

Monoprotection du 1,4-diaminobutane : synthèse de (3) (Hassen, Nielsen, Ehrbar, Buchardt, *Synthesis*, 1982, 404-405)

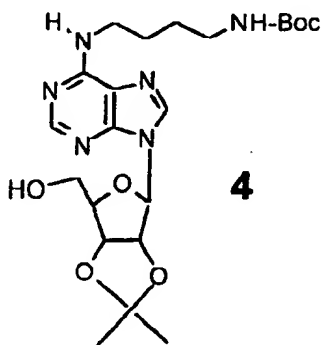
15



La solution de 1,4-diaminobutane (0,113 mol., 9,94 g 11,4 ml) dans le chloroforme (250 ml) est refroidie à 0°C. On ajoute alors goutte à goutte sous argon, une solution de  
 20 ditertbutyldicarbonate (0,022 mol, 4,95 g, 5,22ml) dans du chloroforme (250 ml). Le mélange est agité pendant une nuit à température ambiante. Le précipité formé est filtré et le filtrat est évaporé. L'huile résiduelle est reprise par une solution aqueuse saturée en NaCl (40 ml) : on élimine ainsi le  
 25 produit bisprotégé par filtration. On extrait alors la phase aqueuse avec de l'éther ( 5 x 50 ml). Les phases organiques sont réunies, séchées sur Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> et évaporées. On obtient ainsi le produit (3) sous forme d'huile avec un rendement de 99 % (3,8 g, 0,0218 mol). Le produit (3) a été caractérisé par spectrométrie  
 30 de masse et par RMN du proton.



Substitution du triazolo par le diaminobutane-monoboc : synthèse de (4)



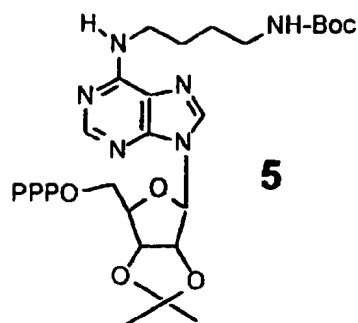
5

On solubilise le produit (2) (500 mg, 1,4 mmol) dans 20 ml d'acétonitrile. On ajoute alors le composé (3) (1,31 g, 7 mmol). Le milieu réactionnel est mis à chauffer à 50°C pendant 2 jours et analysé par CLHP.

- 10       Après évaporation de l'acétonitrile, on reprend le résidu par de l'acétate d'éthyle et on lave cette phase organique avec de l'eau saturée en NaCl. Après séchage et évaporation de l'acétate d'éthyle, le résidu est chromatographié sur gel de silice (éluant : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, puis CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH, 98/2, 95/5
- 15 (v/v)). Après évaporation et précipitation dans l'hexane, on obtient le produit (4) sous forme d'une poudre blanche avec un rendement de 80 % (563 mg, 1,12 mmol). Le nucléoside (4) a été caractérisé par spectrométrie de masse et par RMN du proton.

- 20   Phosphorylation par la méthode de Eckstein (Ludwig, Eckstein, J. Org. Chem., 1989, 54, 631-635)

16



PPP = triphosphate

Le nucléoside (4) (48 mg, 100  $\mu$ mol) est dissous dans de la pyridine anhydre et est évaporé 2 fois. On ajoute alors  
5 sous argon 100 ml de pyridine, 300 ml de dioxane et une solution  
fraichement préparée de 2-chloro-4H-1,2,3-dioxaphosphorin-4-one  
dans du dioxane (130 ml, 130  $\mu$ mol). On laisse l'agitation  
pendant 20 minutes puis on ajoute une solution 0,5 M de  
pyrophosphate de tributylammonium dans du DMF anhydre (320 ml)  
10 et simultanément 130 ml de tributylamine.

Après 30 minutes d'agitation, on ajoute 2 ml d'une  
solution d'iode à 1 % dans un mélange pyridine/eau (98/2, v/v).  
Après 20 minutes d'agitation, on détruit l'excès d'iode avec une  
solution aqueuse de  $\text{NaHSO}_3$  à 5 % et on maintient l'agitation  
15 pendant 10 minutes. On évapore à sec puis on effectue une  
extraction eau/dichlorométhane. On vérifie la formation du  
triphosphate 5 par HPLC (gradient : 0 à 35 % de B en 40 minutes  
; A = Tris HCl 20 mM, pH 7,6 ; B = Tris HCl 20 mM, pH 7,6 + 0,5  
M NaCl). Temps de rétention = 35 minutes.

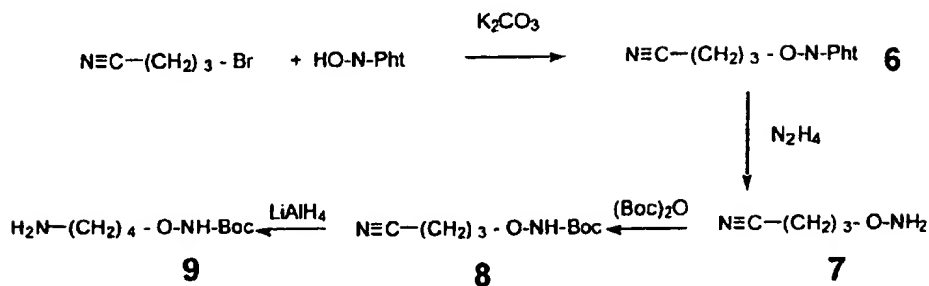
20 Après évaporation, on reprend le résidu dans de l'eau  
(10 ml) puis on ajoute 10 ml d'une solution aqueuse de TFA à 50  
% pour effectuer la déprotection des groupements Boc et  
isopropylidène. Après 30 minutes, le TFA est évaporé et  
coévaporé avec de l'eau. On observe ainsi la formation d'un  
25 nouveau produit avec un temps de rétention de 19 minutes.

17

EXEMPLE 2 : Synthèse du nucléotide adénosin à chaîne oxyamine.

Voie de synthèse de la chaîne

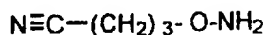
5



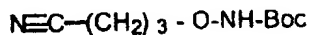
Synthèse du produit (6)

10  $\text{N}\equiv\text{C}-(\text{CH}_2)_3-\text{O-N-Pht} \quad \mathbf{6}$

On dissout l'hydroxyphtalimide (10 g, 0,061 mole) dans du DMF (300 ml). On ajoute alors du  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (1,05 eq., 9 g). On observe la formation d'un précipité. Après 1 h d'agitation à 50°C, on ajoute le dérivé bromé (1 eq., 9,03 g) et on maintient l'agitation à 50°C pendant 2 h. Après filtration sur coton et évaporation du DMF, on reprend le résidu par de l'acétate d'éthyle puis on lave la phase organique avec HCl 1N puis avec une solution de  $\text{NaHCO}_3$  à 10 % et enfin avec une solution aqueuse saturée en NaCl. Après séchage et évaporation, on obtient le produit (6) avec un rendement de 69 % (9,66 g). Il a été caractérisé par RMN du proton, du carbone 13 et par spectrométrie de masse.

Hydrazinolyse : préparation de la chaîne (7)**7**

- 5 Le produit (6) (9,51 g, 0,041 mole) est mis dans 150 ml d'éthanol à 95 %. L'addition d'hydrazine (2 eq., 4 ml) entraîne une solubilisation immédiate du précipité de départ. On observe ensuite la formation d'un précipité blanc de phtalhydrazide. Après 3 heures de réaction à 50°C, on filtre et
- 10 on lave le précipité avec de l'éthanol. Après évaporation, la pâte obtenue est chromatographiée sur gel de silice ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{CN}$  : 9/1, v/v). Après évaporation des fractions contenant l'oxyamine libre (7), on ajoute de l'éther puis de l'acide chlorhydrique concentré. On obtient ainsi le produit (7)
- 15 sous forme d'une poudre blanche avec un rendement de 40 % (2,30 g). Il a été caractérisé par RMN du proton et du carbone 13.

Protection sous forme de Boc de l'oxyamine**8a**

20

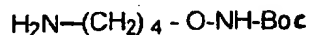
On dissout 2,3 g (0,016 mole) de produit (7) dans 10 ml de dioxane. On ajoute alors une solution aqueuse de soude 1N (2 eq. : 0,032 mole, 32 ml).

- 25 On additionne ensuite goutte à goutte, dans la glace, sous argon, le ditertbutyldicarbonate (1,2 eq., 0,019 mole, 4,18 g) dissous dans 20 ml de dioxane. Après 3 h de réaction à 0°C on évapore le dioxane puis on ramène le pH à 3 avec une solution aqueuse d'HCl 1N et on extrait à l'éther (3x50 ml). On lave ensuite les phases organiques avec une solution aqueuse d'HCl 1N

puis avec une solution aqueuse saturée en NaCl. Après séchage sur Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> et évaporation on obtient le produit (8a) sous forme d'une huile jaune (2,56 g, 0,013 mol, 80 %). Il a été caractérisé par RMN du proton et du carbone 13.

5

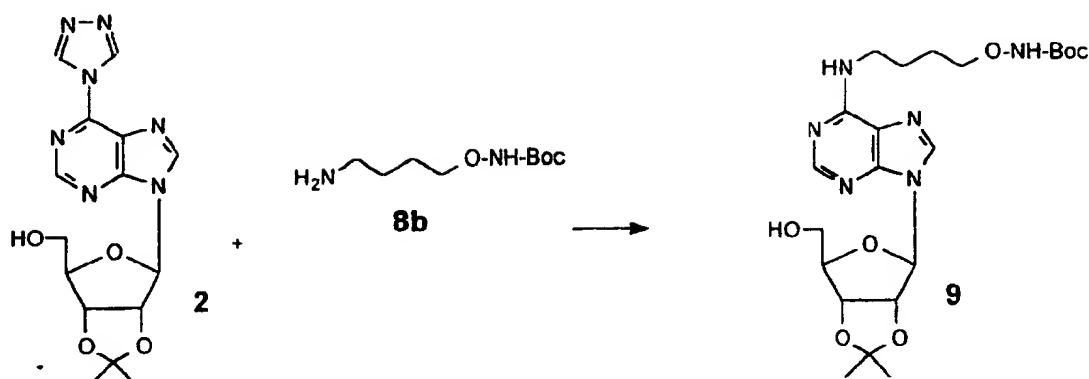
Réduction du nitrile par LiAlH<sub>4</sub>

**8b**

Le composé (8a) (2,56 g, 0,013 mol) est solubilisé dans de l'éther éthylique anhydre (50 ml). Le mélange est refroidi dans un bain de glace. On ajoute alors LiAlH<sub>4</sub> (3 g, 0,079 mol) en trois fois. L'agitation est maintenue pendant une nuit puis on ajoute de l'eau (10 ml) et une solution aqueuse de soude à 15 %. Après filtration du précipité blanc ainsi formé on lave la phase organique avec une solution aqueuse saturée en NaCl. Après séchage sur Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> et évaporation on obtient le produit 9 sous forme d'huile (769 mg, 0,0037 mol, 29 %). Il a été caractérisé par RMN du proton et du carbone 13. La chaîne (8b) a été caractérisée par RMN du proton et du carbone 13

20

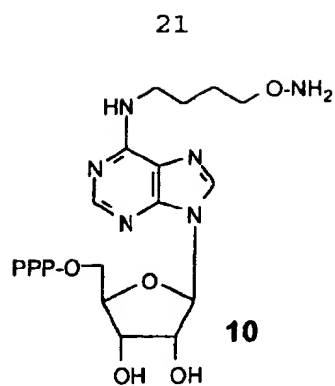
Substitution du triazolo par la chaîne oxyamine :



Le produit (**2**) (246 mg, 0,68 mmol) est dissous dans 20 ml d'acétonitrile. On ajoute alors la chaîne (**8b**) (700 mg, 3,43 mmol). Le mélange est porté à 50°C. La réaction est suivie par HPLC : elle évolue très lentement. Après une semaine, le solvant est évaporé. Le résidu obtenu est dissous dans de l'acétate d'éthyle et la phase organique est lavée avec de l'eau saturée en NaCl. Après séchage sur Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> et évaporation on obtient une huile jaune que l'on chromatographie sur gel de silice (éluant : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH : 97/3, v/v). Après évaporation du solvant on obtient le produit (**9**) sous forme d'une poudre blanche (120 mg, 0,24 mmol, 35 %). Le produit (**9**) est caractérisé par RMN du proton et par spectrométrie de masse.

15 Phosphorylation du nucléoside (**9**) .:

La phosphorylation du nucléoside (**9**) en nucléotide (**10**) est réalisée selon le protocole décrit dans l'exemple I (préparation du nucléotide **5**).

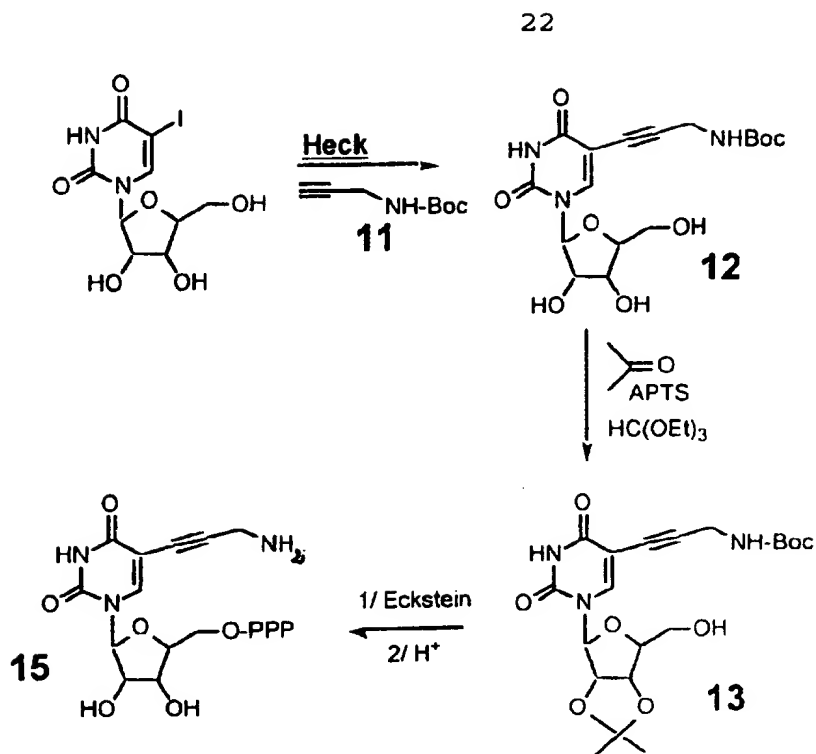


## II- Série uridine:

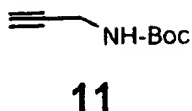
5

EXEMPLE 3 : synthèse de l'uridine à chaîne amine (15).

Voie de synthèse :



### Synthèse de la chaîne :

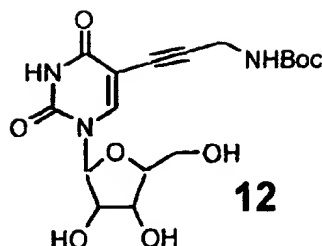


5 ml de propargylamine (73 mmol) sont dissous dans un  
 5 mélange NaOH 1N/dioxane (146 ml/50ml). On ajoute alors goutte à  
 goutte, à 0°C, sous argon, 20 ml de Boc<sub>2</sub>O dissous dans 50 ml de  
 dioxane. On observe la formation d'un précipité. Après 8 h, le  
 précipité de carbonate est filtré puis on ramène le pH à 3 avec  
 une solution aqueuse d'HCl 1N et on extrait avec du  
 10 dichlorométhane. La phase organique est ensuite lavée avec une  
 solution aqueuse saturée en NaCl puis séchée sur Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> et enfin  
 évaporée. Par addition d'hexane le produit (11) précipite. On  
 récupère ainsi 8,92 g (0,057 mmol, 79 %). Le produit (11) a été  
 caractérisé par RMN du proton et par spectrométrie de masse.

15

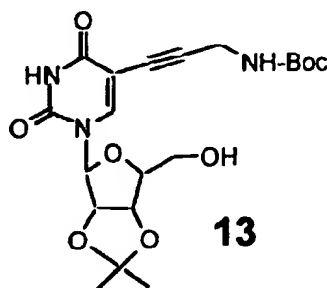
Introduction de la chaîne sur la base : Couplage de Heck (Hobbs,  
*J. Org. Chem.*, 1989, 54, 3420-3422).





10 ml de DMF sont dégazés et placés sous argon. On ajoute alors de la iodouridine (1 g, 2,56 mmol, Aldrich, 85529-  
 5 7) et de l'iodure de cuivre (97,5 mg, 0,512 mmol). La réaction est placée à l'obscurité puis on ajoute, toujours sous argon, de la triéthylamine (713 ml, 518 mg, 5,12 mmol) et la chaine-Boc (11) (1,2 g, 7,68 mmol). Le mélange est laissé sous argon pendant 10 minutes. Le démarrage de la réaction est réalisé par  
 10 addition du catalyseur tétrakistriphénylphosphine palladium (296 mg, 0,256 mmol). La réaction est suivie par HPLC. Après une nuit, le DMF est évaporé et coévaporé avec de l'acétonitrile. Le résidu obtenu est chromatographié sur gel de silice (dépot solide, éluant : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> / MeOH : 98/2, 95/5, 90/10, 85/15-  
 15 v/v). Après évaporation on obtient 528 mg de produit (12) (1,3 mmol, 52 %). Le produit (12) a été caractérisé par RMN du proton et par spectrométrie de masse.

Protection sous forme d'isopropylidène (Townsend, Tipson,  
 20 Nucleic acid chemistry, part 2, p. 765, Wiley-interscience).

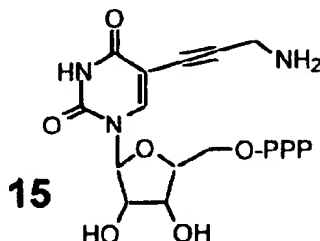


On ajoute, sous argon à température ambiante, l'orthoformate d'éthyle (166 ml, 148 mg, 1 mmol) à une

suspension de produit (12) (200 mg, 0,5 mmol) dans l'acétone (2 ml) contenant de l'APTS (9,5 mg, 0,05 mmol). La réaction est suivie par CCM (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> / MeOH 90/10). Après 2 heures on ajoute du dichlorométhane et on lave la phase organique avec une solution aqueuse de NaHCO<sub>3</sub> à 10 % puis avec une solution aqueuse saturée en NaCl. Après séchage et évaporation on obtient le produit (13) sous forme d'une poudre jaune (167 mg, 0,38 mmol, 76 %).

Phosphorylation par la méthode de Eckstein et déprotection

10 (Ludwig, Eckstein, *J. Org. Chem.*, 1989, 54, 631-635)



Le nucléoside 13 (44 mg, 100 μmol) est dissous dans de la pyridine anhydre et est évaporé 2 fois. On ajoute alors sous argon 100 ml de pyridine, 300 ml de dioxane et une solution fraîchement préparée de 2-chloro-4H-1,2,3-dioxaphosphorin-4-one dans du dioxane (130 ml, 130 μmol). On laisse l'agitation pendant 20 minutes puis on ajoute une solution 0,5 M de pyrophosphate de tributylammonium dans du DMF anhydre (320 ml) et simultanément 130 ml de tributylamine.

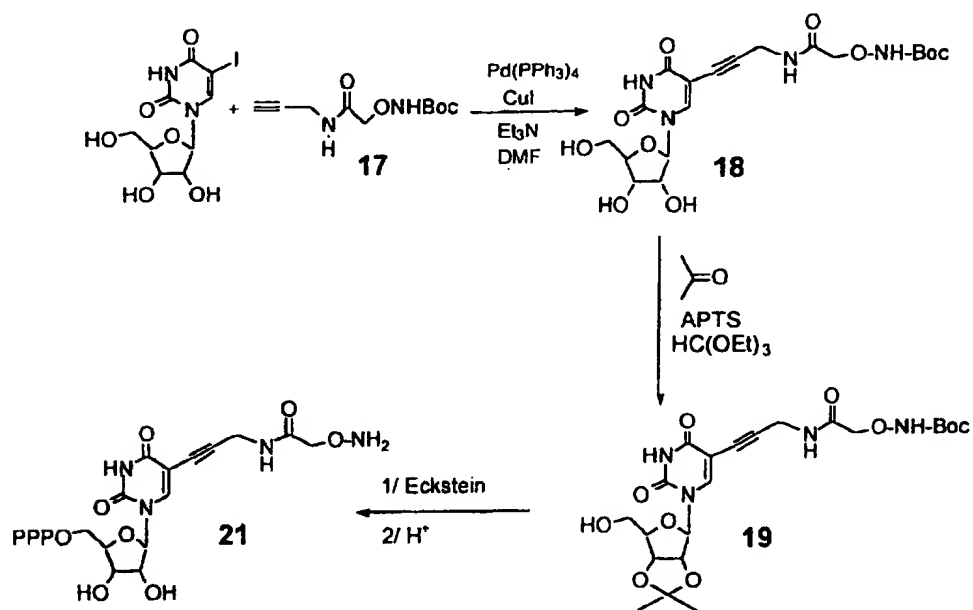
Après 30 minutes d'agitation, on ajoute 2 ml d'une solution d'iode à 1 % dans un mélange pyridine/eau (98/2, v/v). Après 20 minutes d'agitation, on détruit l'excès d'iode avec une solution aqueuse de NaHSO<sub>3</sub> à 5 % et on maintient l'agitation pendant 10 minutes. On évapore à sec puis on effectue une extraction eau/dichlorométhane. On vérifie la formation du triphosphate par CLHP (gradient : 0 à 35 % de B en 40 minutes ; A = Tris HCl 20 mM, pH 7,6 ; B = Tris HCl 20 mM, pH 7,6 + 0,5 M NaCl). Temps de rétention = 36 minutes.

Après évaporation, on reprend le résidu dans de l'eau (10 ml) puis on ajoute 10 ml d'une solution aqueuse de TFA à 50 % pour effectuer la déprotection des groupements Boc et isopropylidène. Après 30 minutes, le TFA est évaporé et  
 5 coévaporé avec de l'eau. On observe ainsi la formation d'un nouveau produit (15) avec un temps de rétention de 20 minutes.

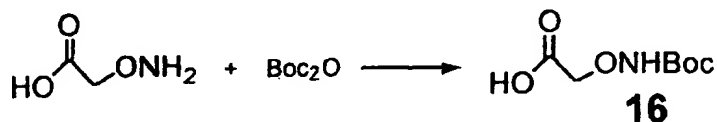
#### EXEMPLE 4 : Synthèse de l'uridine à chaîne alcoxyamine

21.

##### 10 Voie de synthèse :



Synthèse de la carboxyméthoxyamine-boc 16 (Kurth et al, *J. Med. Chem.* , 1993, 1255-1261.)

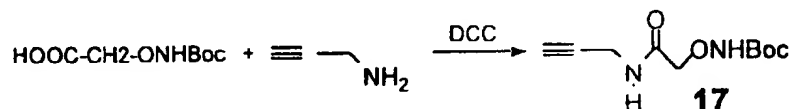


15

Le chlorhydrate de carboxyméthoxyamine (6,6 g, 60,4 mmol) est dissous dans 132 ml d'eau en présence de soude (2 g,

50 mmol) et de dioxane (66 ml). La solution est refroidie dans un bain de glace. On ajoute goutte à goutte du di-tert-butylidicarbonate (13,97 g, 64,1 mmol) dissous dans le dioxane (66 ml). L'agitation est maintenue pendant une nuit à  
 5 température ambiante. On évapore à sec le mélange réactionnel. Au précipité obtenu, on additionne 250 ml d'eau puis on extrait à l'éther (2x250 ml). On acidifie la phase aqueuse par HCl 1N jusqu'à pH 3. Ensuite, on extrait cette phase par de l'éther éthylique (3x50 ml) et par de l'acétate d'éthyle (3x250 ml). Les  
 10 phases organiques sont réunies et séchées sur sulfate de sodium. Après évaporation on obtient le produit (16) sous forme d'une poudre blanche (10 g, 52 mmol, 86 %). Le produit (16) a été caractérisé par RMN du proton.

15 Synthèse de la chaîne par couplage peptidique (Costa, Dominguez, Cutts, Williams, Bowen, *J. Med. Chem.*, 1994, 37, 314-321).

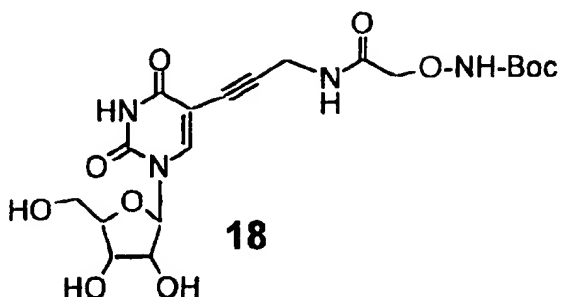


On dissout le produit (16) (2 g, 10,4 mmol) dans du  
 20 THF fraîchement distillé. Après refroidissement du milieu dans la glace, on ajoute (2,15 g, 10,4 mmol) de DCC. Le mélange est agité à froid pendant 15 minutes. On ajoute alors l'amine propargylique (714 ml, 10,4 mmol). L'agitation est maintenue à température ambiante sous argon pendant 2 heures. Après  
 25 filtration, le solvant est évaporé. Le résidu ainsi obtenu est repris dans du dichlorométhane et est lavé avec une solution aqueuse de HCl 1N, puis avec une solution de NaHCO<sub>3</sub> à 5 % et enfin avec une solution aqueuse saturée en NaCl. Après séchage sur Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, le dichlorométhane est évaporé et le résidu est  
 30 chromatographié sur gel de silice (éluant : acétate d'éthyle/hexane 60/40, v/v). On obtient ainsi le produit (17) sous forme d'une poudre blanche (1,23 g, 5,4 mmol, 52 %). Le

produit (17) a été caractérisé par RMN du proton et par spectrométrie de masse.

Couplage de Heck: Hobbs, J. Org. Chem., 1989, 54, 3420-3422.

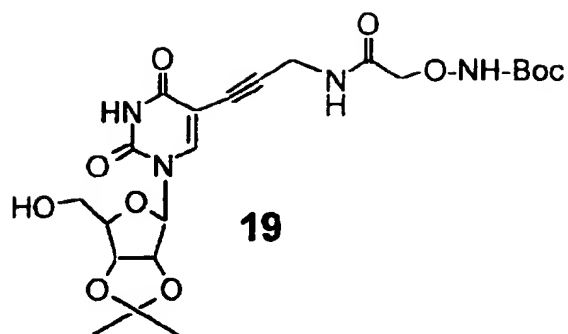
5



10 ml de DMF sont dégazés et placés sous argon. On ajoute alors de la iodouridine (1g, 2,56 mmol) et de l'iodure de cuivre (97,5 mg, 0,512 mmol). La réaction est placée à l'obscurité puis on ajoute, toujours sous argon, de la triéthylamine (713 ml, 518 mg, 5,12 mmol) et la chaîne (17) (1,75 g, 7,68 mmol). Le mélange est laissé sous argon pendant 10 minutes. Le démarrage de la réaction est réalisé par addition du catalyseur tétrakistriphénylphosphine palladium (296 mg, 0,256 mmol). La réaction est suivie par HPLC. Après une nuit, le DMF est évaporé et co-évaporé avec de l'acétonitrile. On reprend le résidu obtenu par de l'acétate d'éthyle et on lave cette phase organique avec une solution aqueuse saturée en NaCl. Après évaporation de l'acétate d'éthyle le résidu est chromatographié sur gel de silice (éluant : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> / MeOH : 90/10, 85/15, 80/20, v/v). Après évaporation on obtient 747 mg de produit (18) (1,6 mmol, 62 %). Le nucléoside (18) a été caractérisé par RMN du proton et par spectrométrie de masse.

25 Protection sous forme d'isopropylidène (Townsend, Tipson, Nucleic acid chemistry, part 2, p765, Wiley-Interscience) :

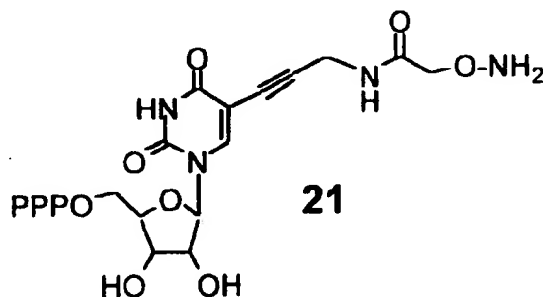
28



On ajoute, sous argon à température ambiante, l'orthoformate d'éthyle (355 ml, 316 mg, 2,13 mmol) à une suspension de produit (18) (500 mg, 1,06 mmol) dans l'acétone (3 ml) contenant de l'APTS (20,2 mg, 0,10 mmol). La réaction est suivie par CCM (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> / MeOH 90/10). Après 3 heures on ajoute du dichlorométhane et on lave la phase organique avec une solution aqueuse de NaHCO<sub>3</sub> à 10 % puis avec une solution aqueuse saturée en NaCl. Après séchage et évaporation on obtient le produit (19) sous forme d'une poudre jaune (395 mg, 0,77 mmol, 73 %). Le nucléoside protégé 19 a été caractérisé par RMN du proton du carbone 13 et par spectrométrie de masse.

#### Phosphorylation par la méthode de Eckstein et déprotection

(Ludwig, Eckstein, *J. Org. Chem.*, 1989, 54, 631-635)



Le nucléoside (19) (102 mg, 200 mmol) est dissous dans de la pyridine anhydre et est évaporé 2 fois. On ajoute alors sous argon 200 ml de pyridine, 600 ml de dioxane et une solution fraîchement préparée de 2-chloro-4H-1,2,3-dioxaphosphorin-4-one dans du dioxane (260 ml, 260 mmol). On

laisse l'agitation pendant 20 minutes puis on ajoute une solution 0,5 M de pyrophosphate de tributylammonium dans du DMF anhydre (640 ml) et simultanément 260 ml de tributylamine.

Après 30 minutes d'agitation, on ajoute une solution  
5 d'iode à 1 % dans un mélange pyridine/eau (98/2, v/v) (4 ml, 314 mmol). Après 20 minutes d'agitation, on détruit l'excès d'iode avec une solution aqueuse de  $\text{NaHSO}_3$  à 5 % et on maintient l'agitation pendant 10 minutes. On évapore à sec puis on effectue une extraction eau/dichlorométhane. On vérifie la  
10 formation du triphosphate par CLHP (gradient : 0 à 35 % de B en 40 minutes ; A = Tris HCl 20 mM, pH 7,6 ; B = Tris HCl 20 mM, pH 7,6 + 0,5 M NaCl ; colonne DEAE Waters Protein-Pak 8HR 10x100mm). Temps de rétention = 35 minutes.

Après évaporation, on reprend le résidu dans de l'eau  
15 (5 ml) puis on ajoute 5 ml d'une solution aqueuse de TFA à 50 % pour effectuer la déprotection des groupements Boc et isopropylidène. Après 30 minutes, le TFA est évaporé et co-évaporé avec de l'eau. On observe ainsi par HPLC la formation d'un nouveau produit (21) avec un temps de rétention de  
20 30 minutes. Ce produit est purifié par HPLC dans les conditions décrites précédemment, puis dessalé (Eau milliQ en isocratic, Colonne Macherey Nagel C18 nucleosil).

### 25 III- Série cytidine:

#### I- Synthèse des nucléotides triphosphates modifiés en position 4 par la présence d'une chaîne alkylaminée

30 Afin d'introduire une chaîne alkyl aminée en position 4 de la base, cette dernière a été activée par l'introduction du groupe tosylo selon la méthode de Czernecki et coll. ( S.

Czernecki, T. Lediguarher, J.M. Valéry, *Nucleosides & Nucleotides*, 1989, 54, 631-635) à partir de la [2',3'-O-isopropylidène, 5'-O-butyltriméthylsilyl]-uridine.

La substitution nucléophile du groupe tosyloxy par une chaîne alkyl diaminée suivie de la protection par le trifluoroacétate d'éthyle de la fonction amino libre de la chaîne introduite, est réalisée en une étape.

La déprotection de la fonction hydroxyle en position 5' libère le nucléoside modifié, lequel est finalement triphosphorylé sur cette position selon la méthode de Ludwig-Eckstein (J. Ludwig, F. Eckstein, *J. Org. Chem.*, 1989, 54, 631-635) décrite dans les exemples précédents.

L'hydrolyse des groupes protecteurs des fonctions hydroxyles en 2' et 3' ainsi que de celui de la fonction amino de la chaîne introduite en 4, conduit aux nucléotides triphosphates désirés (Figure 1).

Une autre stratégie qui consiste en l'introduction directe de la chaîne aminée en position 4 du nucléotide par transamination a été utilisée pour préparer les nucléotides (33) et (34) (Figure 3).

**EXEMPLE 5: Synthèse de la [2',3' -O-isopropylidène, 5' -O-butyltriméthylsilyl]-uridine (22).**

La solution de la 2',3' -O-isopropylidène-uridine (1mmole, Sigma, I-5127) dans la pyridine (5 ml) est traitée par le chlorure de t-butyltriméthylsilyl pendant une nuit sous argon à température ambiante. La réaction est ensuite arrêtée par l'addition de l'éthanol absolu (2 ml) évaporée puis co-évaporée avec le toluène. Le produit (22) est purifié par chromatographie sur gel de silice (éluant : acétate d'éthyle/hexane 1 :1, v :v,  $R_f = 0.3$ ).



**EXEMPLE 6: Synthèse de la [2',3' -O-isopropylidène, 5'-O-t-butyldiméthylsilyl-4-p-toluène sulfonyl]-uridine (23).**

Le composé (22) (1 mmole) dans l'acétonitrile (17 ml) est porté au reflux en présence du carbonate de potassium (1.3 mmole, 1.3 éq.) et du chlorure de p-toluène sulfonyle (1.2 mmole, 1.2 éq.) pendant 3 heures. Après disparition totale du produit de départ, la réaction est hydrolysée à température ambiante par addition de l'eau (2 ml) puis évaporée à sec. Le résidu obtenu est traité par une partition acétate d'éthyle-eau et est utilisé tel quel pour l'étape suivante.

CCM : Rf = 0.7 (éluant : acétate d'éthyle-hexane 1:1, v:v). Le nucléoside 23 a été caractérisé par

RMN du proton (200MHz, CDCl<sub>3</sub>) : d = 8,3 ppm (1H, d, H-6); 6,8(2H, d, H-aroma); 7,3(2H, d, H aroma) ; 6,1(1H, d, H-5); 5,8(1 H, s, H-1') ; 4,7 (2H, s, H-2', H-3') ; 4,4 (1 H, m, H-4'); 4,0-3,7(2H, m, H-5'a, H-5'b); 2,4 (3 H, s, CH<sub>3</sub>); 1,6 - 1,3(2 x 3H, 2 x s, 2xCH<sub>3</sub>-isoprop); 0,8 (9H,s, 3xCH<sub>3</sub>) , 0,1(6 H, s, 2x CH<sub>3</sub>).

**EXEMPLE 7: Synthèse de la [4-N-alkyl trifluoroacétyl amino-2',3'-O-isopropylidène, 5'-O-t-butyldiméthylsilyl]-cytidine (24).**

A une solution de (23) (1 mmole) dans le dichlorométhane (5 ml) est ajouté à température ambiante et sous argon, le réactif alkyl diaminé (5 mmole, 5 éq). Après 5 min d'agitation, un excès de trifluoroacétate d'éthyle (15 mmole, 15 éq.) est additionné au milieu réactionnel et l'agitation maintenue durant 15 min. Le nucléoside désiré (24) est purifié par chromatographie sur gel de silice (éluant : acétone-hexane 1:2, v:v, Rf = 0.2). La structure des nucléosides intermédiaires (24) complètement protégés est confirmée par RMN du proton.

Exemple du nucléoside (24a) : RMN (200MHz, CDCl<sub>3</sub>), d = 7,7 - 7,5 ppm (2H, m, H-6, NH); 5,9(1 H, s, H-1') ; 5,7 (1H, sl, NH); 5,6

(1H, d, H-5); 4,7 (2H, 1, H-2', H-3'); 4,3 (1 H, m, H-4'); 4,0 - 3,7 (2H, m, H-5'a, H-5'b); 3,7 - 3,5 (m, 12 H, 6 x CH<sub>2</sub>); 1,6 - 1,3 (2 x 3 H, 2 x 1, 2 x CH<sub>3</sub> isoprop) ; 0,8 (9H, 1, 3xCH<sub>3</sub>) , 0,1 (1, 6H, 2xCH<sub>3</sub>)

5

**EXEMPLE 8: Synthèse de la [4-N-alkyl trifluoroacétyl amino-2',3'-O-isopropylidène]- cytidine (25) :**

Le composé (24) (1 mmole) dessous dans le THF (5 ml) est traité par une solution molaire de fluorure de tétrabutylammonium (1,2 mmoles, 1,2 éq) dans le THF. Après 3 à 4 heures d'agitation à température ambiante et sous argon, la  
10 réaction est neutralisée par l'acide acétique (1 éq.) puis évaporée à sec. Le composé (25) est purifié par chromatographie sur gel de silice (éluant acétone-hexane 1 :1, v :v, Rf = 0.3).

15

**EXEMPLE 9: Synthèse de la [4-N-alkyl trifluoroacétyl amino-2',3'-O-isopropylidène-5'-O-triphosphate]-cytidine (26).**

Le composé (25) (0.2 mmoles) est co-évaporé avec la  
20 pyridine (2 x 1 ml) puis mis en solution dans 400 ml d'un mélange pyridine-dioxane (1:3, v :v). Une solution de chlorure de dioxaphosphorinone (260 µl) est ajoutée à la réaction. Un précipé blanc se forme au bout de 5 à 10 min et après 20 min d'agitation une solution de pyrophosphate de butylammonium dans  
25 le DMF (0,5 M, 640 µl, 1,6 éq.) suivie de la tributylamine (230 ml) est ajoutée à la réaction. Après 30 min d'agitation, la réaction est oxydée par une solution d'iode à 1 % dans le mélange pyridine-eau (98 :2, v :v) (4 ml) et l'agitation maintenue pendant 30 min. L'excès d'iode est ensuite détruit par  
30 une solution aqueuse de bisulfite de sodium à 5 % et le milieu réactionnel évaporé à sec. Le résidu obtenu est dissout dans l'eau (20 ml) et traité par un lavage au dichlorométhane. La phase aqueuse est récupérée et analysée en HPLC (colonne DEAE 8

HR Millipore 5x100 mm, tampon A : Tris HCl 20 mM pH 7.6, tampon B : Tris HCl 20 mM, 0.5 M NaCl pH 7.6, débit : 0.5 ml/min, gradient : 0 à 35 % B en 40 min). Temps de rétention : 24 à 29 min. CCM : Rf = 0.5, éluant : propanol : eau : NH<sub>4</sub>OH (6:3 :1, 5 v :v :v)

**EXEMPLE 10: Synthèse de la [4-N-alkyl amino-5'-O-triphosphate]-cytidine (27).**

A la solution de (26) (0.2 mmole) dans l'eau (20 ml) est ajouté de l'ammoniac aqueux (10 ml) et l'agitation maintenue durant 1 heure. Le milieu réactionnel est évaporé à sec, puis repris dans l'eau (20 ml) suivi de l'acide trifluoroacétique aqueux à 50 % (10 ml) et l'agitation maintenue pendant 30 min. Le milieu réactionnel est de nouveau évaporé puis co-évaporé à sec avec l'eau. Le composé désiré est purifié et dessalé par HPLC. HPLC analytique : temps de rétention : 17 à 20 min. Purification : colonne préparative Protein Pack 8 HR DEAE 10 x 100 mm, mêmes tampons et gradient utilisés dans l'exemple 9, débit 2 ml/min. Dessalage : colonne RP 18, tampon A : eau, 15 tampon B : méthanol. CCM : Rf = 0.2, éluant : propanol : eau : NH<sub>4</sub>OH (4 : 5 :1, v :v :v) 20

**II- Synthèse des nucléotides triphosphates modifiés en position 4 par la présence d'une chaîne alkyloxyaminée :**

25

Dans un premier temps, on a introduit une chaîne alkyle, hydroxylée à son extrémité, par substitution nucléophile du groupe tosyle en position 4 de la cytidine. Ensuite, nous avons réalisé la réaction de Mitsunobu entre la fonction 30 hydroxyle de la chaîne introduite et la N-phthalamido-hydroxylamine.

L'obtention du nucléotide triphosphate alkyloxyaminé correspondant suit les mêmes étapes de synthèse que celles des nucléotides triphosphates alkylaminés (Figure 2).

5           **EXEMPLE 11:** Synthèse de la [4-N-hexanyl-6-ol-2',3'-O-isopropylidène-5'-t-butyldiméthylsilyl]-cytidine (28).

          A une solution de (23) (1 mmole) dans le dichlorométhane (5 ml) est ajouté à température ambiante et sous argon, le 6-amino-hexanol (5mmoles, 5 équ.). Après 30 min de  
10 réaction le solvant est évaporé à sec, et le composé (28) est purifié par chromatographie sur gel de silice.

**EXEMPLE 12:** Synthèse de la [4-N-hexanyl-6-N-phtalamido-oxyamino-2',3'-O-isopropylidène-5'-t-  
15 butyldiméthylsilyl]-cytidine (29).

          A la solution de (28) (1 mmole) en présence de la triphénylphosphine (3 mmoles, 3 équ.) et de la N-phtalamido-hydroxylamine (3 mmoles, 3 équ.) dans le THF (10 ml) est ajouté le diéthyle azodicarboxylate (le DEAD, 3 mmoles, 3 mmoles, 3  
20 équ.) à température ambiante et sous argon. Après une heure d'agitation, le solvant est évaporé à sec et le composé (29) est purifié par chromatographie sur gel de silice.

**EXEMPLE 13:** Synthèse de la [4-N-hexanyl-6-N-phtalamido-oxyamino-2',3'-O-isopropylidène]-cytidine (30).  
25

          Le composé (30) a été synthétisé selon le protocole décrit dans l'exemple 8.

**EXEMPLE 14:** Synthèse de la [4-N-hexanyl-6-N-phthalamido-oxyamino-2',3'-O-isopropylidène-5'-O-triphosphate]-cytidine (31).

Le composé (31) a été synthétisé selon le protocole décrit dans l'exemple 9. HPLC analytique (conditions dans l'exemple 10) : temps de rétention : 44 min. CCM : R<sub>f</sub> = 0.5, éluant : propanol : eau : NH<sub>4</sub>OH ( 6 : 3 : 1, v : v : v)

**EXEMPLE 15:** Synthèse de la [4-N-hexanyl-6-oxyamine-5'-O-triphosphate]-cytidine (32).

Le nucléotide totalement protégé (32) totalement protégé est déprotégé en 2',3' par l'acide trifluoroacétique selon le protocole décrit dans l'exemple 10. La déprotection de la fonction alkoxyamine est réalisée dans une solution aqueuse de l'hydrazine pendant une nuit à température ambiante. Le nucléotide (32) est ensuite purifié par HPLC dans les mêmes conditions que celles décrites dans l'exemple 10.

**EXEMPLE 16:** Synthèse de la [4-N-(2,2-oxy-bis-éthylamine)-5'-O-triphosphate]-cytidine (33) par transamination.

La cytidine triphosphate (0.1 mmole) est ajoutée à la solution composée du bisulfite de sodium (12 mmoles, 120 éq.) et du chlorhydrate de la 2-2' oxy-bis-éthylamine (7.5 mmoles, 75 éq.) dans l'eau (2.5 ml) dont le pH a été préalablement ajusté à 7.0 par une solution de soude à 10 M, l'agitation étant maintenue à 37°C pendant 3 jours. Le composé (33) est purifié et dessalé par HPLC (voir conditions HPLC dans l'exemple 10).

**EXEMPLE 17:** Synthèse de la [4-N-(acide adipique-hydrazide)-5'-O-triphosphate]-cytidine (34) par transamination.

Le nucléotide (34) a été préparé par transamination selon le protocole décrit dans l'exemple 16, en utilisant l'acide adipique dihydrazide (83mg, 0,44moles) pour l'introduction de la fonction hydrazide. Sa purification et son  
5 dessalage ont été aussi réalisés selon l'exemple 10, sa structure a été confirmée par RMN du proton.

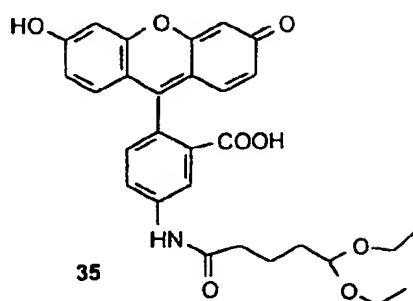
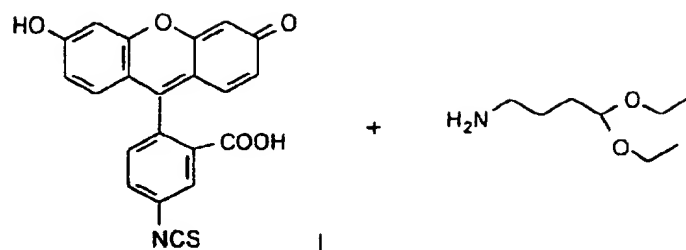
#### IV- Fluorophore fonctionnalisé:

10

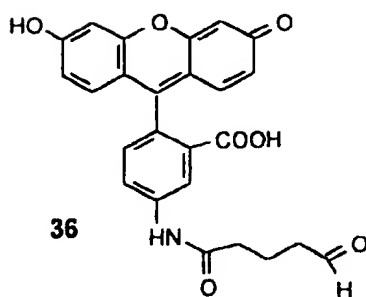
#### EXEMPLE 18 : Synthèse de fluorescéine-aldéhyde (36).

Voie de synthèse :

37

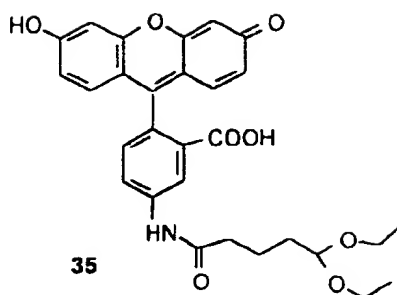


$\downarrow$   $\text{CH}_3\text{COOH}$  30%



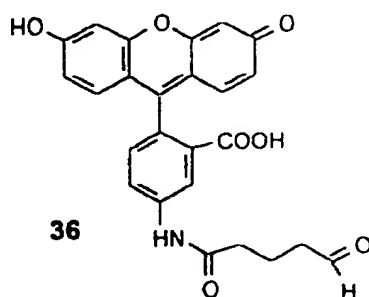
Couplage du FITC avec l'aldéhyde protégé :

38



L'isothiocyanate de fluorescéine (913 mg, 2,35 mmol, Aldrich, F 250-2) est dissous dans du DMF anhydre (10 ml), sous argon. On ajoute alors l' aminobutylaldéhyde diéthylacétal (421 mg, 392 ml, 235 mmol). Au bout d'une heure le DMF est évaporé et le résidu est chromatographié sur gel de silice (éluant :  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  /MeOH : 90/10, v/v). Après évaporation du solvant on obtient le produit (35) sous forme d'une poudre orange (1,21 g, 2,2 mmol, 94 %). Il a été caractérisé par RMN du proton et par spectrométrie de masse.

Déprotection de l'aldéhyde :



Le produit protégé (35) (342 mg, 0,62 mmol) est placé dans 20 ml d'une solution aqueuse d'acide acétique à 30 %. Après une heure de réaction on évapore le solvant et on co-évapore avec de l'acétonitrile. Le résidu obtenu est chromatographié sur gel de silice (éluant :  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  /MeOH : 90/10, v/v). Après évaporation du solvant on obtient le produit (36) sous forme d'une poudre orange (145 mg, 0,30 mmol, 48 %). Il a été caractérisé par RMN du proton et par spectrométrie de masse.

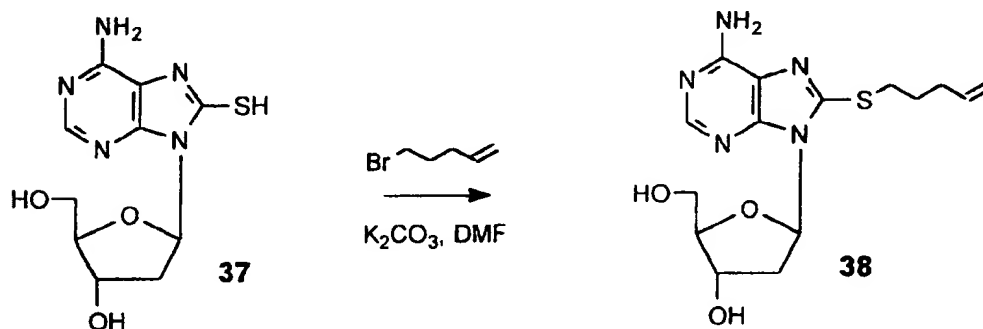


**EXEMPLE 19 : Synthèse chimique d'un polynucléotide préfonctionnalisé.**

Synthèse du nucléoside de départ 2'-désoxy-8-(pentényl)-thioadénosine (38):

La synthèse du nucléoside de départ a été réalisée en utilisant le précurseur 2'-désoxy-8-mercaptoadénosine (37) obtenu selon la stratégie décrite par A. LAAYOUN, J.-L. DECOUT et J. LHOMME dans Tetrahedron Lett., 1994, 35, 4989-4990.

10

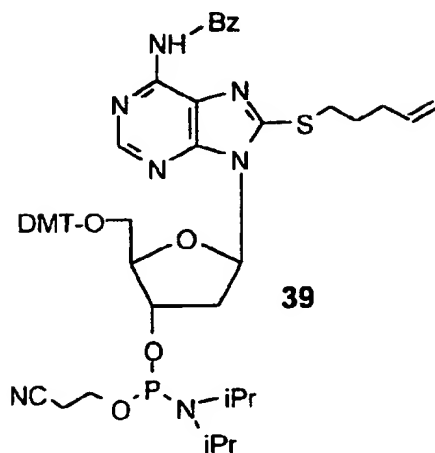


Le 2'-désoxy-8-mercaptoadénosine (16,68 mmol) est dissous dans du DMF (Diméthyl formamide) anhydre en présence d'un excès de carbonate de potassium (33,00 mmol). Après addition sous argon de 1-bromopent-4-ène (18,37 mmol) et une incubation de trois heures sous agitation à température ambiante, les sels minéraux sont filtrés sur célite et la DMF est évaporée. Un résidu marron est obtenu et lavé à l'hexane puis à l'éther éthylique. Le produit est ensuite purifié par chromatographie sur colonne de silice (éluant: CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/CH<sub>3</sub>OH - 95/5(v/v) puis 90/10(v/v)). Le nucléotide de départ ainsi obtenu est caractérisé par les méthodes spectroscopiques usuelles.

**Synthèse chimique d'un polynucléotide préfonctionnalisé:**

Dans un premier temps, le nucléoside synthétisé précédemment est incorporé dans un oligonucléotide. A cet effet, un synthon phosphoramidite (39) correspondant au nucléoside de départ, protégé, a été préparé selon la stratégie décrite par A.

J. ROGERS dans "Oligonucleotide synthesis" (1984), p23-34, M.J. GAIT Ed., IRL Press, Oxford.



5           Bz = Benzoyl  
             DMT = diméthoxytrityl

L'amine exocyclique de l'adénine est protégée par un groupement benzoyle, l'hydroxyle en 5' est protégé par le diméthoxytrityle et l'hydroxyle en 3' par le groupement N,N-diisopropyl-2-cyanoéthylphosphoramidite.

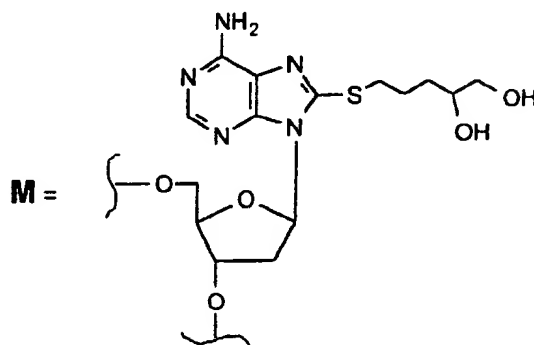
Le polynucléotide 5'CGCACLCACGC 3', dans lequel L est la 2'-désoxy-8-(pentényl)-thioadénosine, a été synthétisé sur un appareil Milligen/Biosearch 8700 selon la méthode au phosphoramidite par voie automatique conformément au protocole proposé par le constructeur.

La purification du polynucléotide synthétisé est réalisée par HPLC en phase inverse (colonne semi-préparative Macherey Nagel 10 mm x 25 cm; C18; 5 µm de porosité; éluant: gradient de 20 min de 0 à 30% d'acétonitrile en mélange avec une solution aqueuse d'acétate d'ammonium 0,1 M à pH 6). Les fractions contenant le polynucléotide sont collectées et lyophilisées.

Après traitement de l'oligonucléotide par de l'acide acétique (80% dans l'eau) pendant 10min à température ambiante,

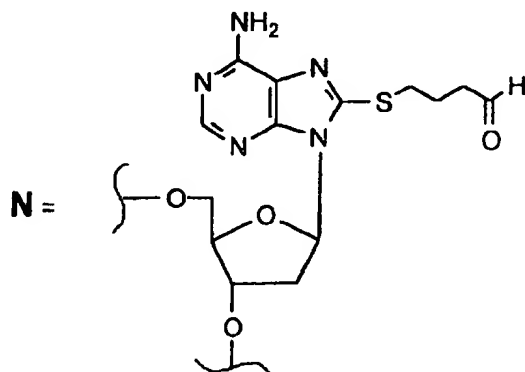
la position 5' du polynucléotide est détritylée puis isolé après extraction à l'éther.

Dans un second temps, le nucléotide L incorporé à l'étape précédente est activé de façon à obtenir le polynucléotide diol 5'CGCACMCACGC 3', dans lequel



340 nmol de polynucléotide 5'CGCACLCACGC 3' sont traités avec une solution composée de 170  $\mu$ l de tétroxyde d'osmium 0,02%, 2  $\mu$ l de N-méthylmorpholine-N-oxyde et de 2  $\mu$ l de  $H_2O_2$  3%. Après une incubation d'une nuit à température ambiante, le polynucléotide 5'CGCACMCACGC 3' est purifié par HPLC selon les conditions décrites précédemment.

Enfin, le polynucléotide aldéhyde 5'CGCACNCACGC 3' dans lequel

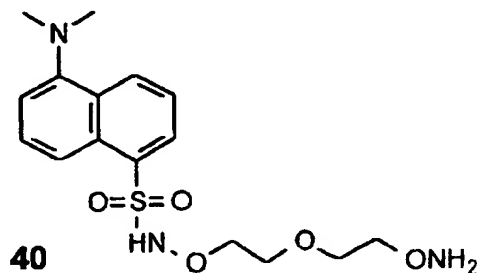


est obtenu en ajoutant à l'obscurité 200  $\mu$ l du métapériodate de sodium 54  $\mu$ M à 200  $\mu$ l d'une solution aqueuse

110 nM d'oligonucléotide diol 5'CGCACMCACGC 3'. Après 15 min, le polynucléotide aldéhyde 5'CGCACNCACGC 3' est purifié par HPLC (colonne semi-préparative Macherey Nagel 10 mm x 25 cm; C18; 7 µm de porosité; éluant: gradient de 20 min de 0 à 30% de 5 méthanol en mélange avec une solution aqueuse de dihydrogénophosphate de sodium 20mM à pH6).

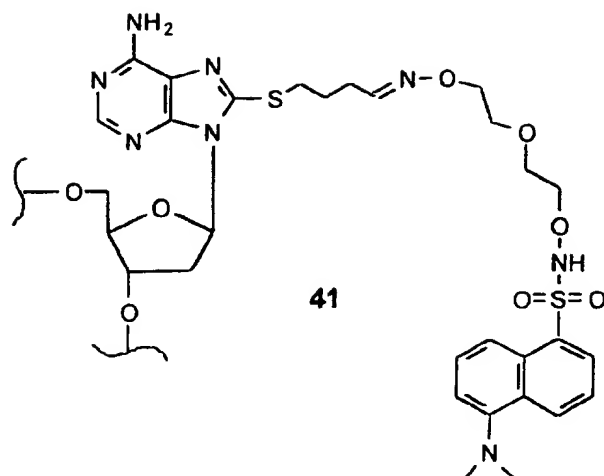
**EXEMPLE 20 : Marquage du polynucléotide**  
10 préfonctionnalisé obtenu a l'exemple 19 :

La réaction de marquage est réalisée à l'aide du réactif (40) consistant en un noyau dansyle comme groupement fonctionnel fluorescent lié par l'intermédiaire d'une chaîne 15 diéthylène glycol à une fonction oxyamine (nucléophile). Ce réactif a été préparé selon la méthode décrite D. BOUTURYN et al. Dans Tetrahedron, 1997, 53, 5485-5492.



20 La réaction de marquage est réalisée dans l'eau en présence d'un léger excès de réactif (40) (1,5 équivalent) par rapport à l'oligonucléotide. Le suivi de la réaction par HPLC indique une disparition rapide des produits de départ et la formation d'un nouveau produit correspondant au polynucléotide 25 fonctionnalisé (41). L'analyse du spectre de RMN du proton confirme par ailleurs l'accrochage du marqueur dansyle.

43

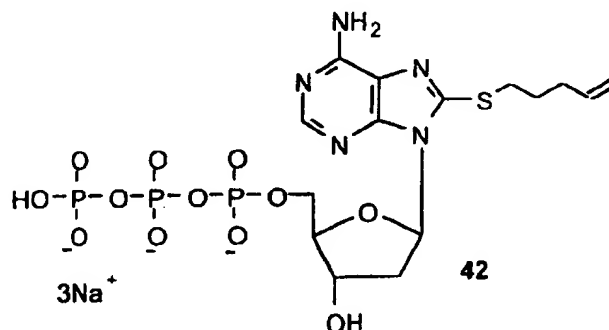


**EXEMPLE 21 : Synthèse enzymatique d'un polynucléotide préfonctionnalisé par transcription.**

5

Synthèse du nucléotide préfonctionnalisé: 2'-désoxy-8-(butanal)-thioadénosine-5' triphosphate (43):

Cette synthèse est réalisée en utilisant le 2'-désoxy-8-(pentényl)-thioadénosine (38) (voir Exemple 19). Le nucléotide de départ (42) est obtenu selon la méthode décrite par J. LUDWIG et F. ECKSTEIN dans J. Org. Chem., 1989, 54, 631-635.



Les étapes d'oxydation nécessaires à l'obtention du nucléotide préfonctionnalisé 43 sont réalisées comme indiqué dans l'Exemple 19 :

Incorporation enzymatique du nucléotide préfonctionnalisé (43):

## a) Préparation de la matrice ADN portant un promoteur

Une PCR est réalisée sur le gène HIVgag porté dans un plasmide pGEM linéarisé, en utilisant un primer classique, et une amorce portant la séquence sens d'un promoteur pour l'ARN polymérase du phage T7 en amont d'une séquence d'amorce classique.

## Séquence des amorces :

10 Amorce classique (n° 4014) :

5'- AGTGGGGGGACATCAAGCAGCCATGCAAA 3'

Amorce promoteur(n°4003):

5'AATTCTAATACGACTCACTATAGGGTGCTATGTCACTTCCCCTTGGTTCTCTCA- 3'

On obtient un produit de 158 paires de bases, qui est purifié par extraction phénol/chloroforme et passage sur microcon 30.

## b) Réaction de transcription :

Les réactions de transcription sont réalisées en tubes Eppendorf dans un volume final de 25  $\mu$ l, dans un tampon 40 mM de Tris/HCl, pH 8,1, 20 mM de MgCl<sub>2</sub>, 5 mM de Dithiotreitol, 1 mM de spermidine, 8% de polyéthylène glycol, 0,01% de Triton X 100, 50  $\mu$ g/ml de d'albumine de sérum bovin. Le nucléotide préfonctionnalisé (43) et les quatre ribonucléotides (CTP, GTP, ATP, UTP) sont ajoutés respectivement à la concentration de 1,33 mM et 4 mM chacun. La matrice PCR est ajoutée à la concentration de 10<sup>9</sup> copies/ $\mu$ l, et l'ARN polymérase du phage T7 (Demande de brevet FR 97 04166) à la concentration de 1 u/ $\mu$ l. La réaction est incubée durant 60 min à 37°C. 0,5 u/ $\mu$ l de DNase 1 sont ajoutés au milieu afin de détruire la matrice ADN. L'échantillon est incubé à 37°C continue pendant 15 min. Les ARN obtenus sont purifiés par un passage sur Sephadex G50.

En parallèle, un premier contrôle est effectué avec une réaction sans addition de T7 ARN polymérase. Un second contrôle est réalisé sans nucléotide activé, comme témoin de la transcription.

Les produits de transcription purifiés sont marqués selon le mode expérimental décrit à l'Exemple 2 et visualisés sous lampe ultra violette après migration électrophorétique en gel d'agarose.

5

**EXEMPLE 22 : Synthèse d'un polynucléotide préfonctionnalisé au cours d'une réaction d'amplification TMA.**

Pour permettre le marquage intense des produits  
10 d'amplification TMA, on incorpore des nucléotides préfonctionnalisés 27a (CTP-(N4)-C<sub>6</sub>O<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>), 27b (CTP-(N4)-C<sub>4</sub>-NH<sub>2</sub>), 32 (CTP-(N4)-C<sub>6</sub>-ONH<sub>2</sub>), dans les amplicons. Des réactions d'amplification sont menées en parallèle en présence d'un nucléotide marqué portant une fluorescéine, l'UTP-12-  
15 fluorescéine (Boehringer, ref 1 427 857.

Les nucléotides préfonctionnalisés 27a, 27b, 32, et à titre de comparaison, le nucléotide marqué de Boehringer, ref 1 427 857, sont testés pour leur incorporation dans les produits de la réaction d'amplification TMA, selon les kits  
20 Gen-Probe amplified<sup>TM</sup> MTD2 (amplified *Mycobacterium tuberculosis* direct test). Cette réaction permet l'amplification d'un fragment de 136 bases de l'ARN 16S des mycobactéries. Elle utilise quatre activités enzymatiques (ARN polymérase ADN dépendante, ADN polymérase ADN dépendante, ADN  
25 polymérase ARN dépendante, et ribonucléaseH) et deux enzymes, la T7 ARN polymérase, et la transcriptase inverse AMV. Par des réactions récurrentes impliquant des étapes de transcription, de reverse transcription, et de digestion de l'ARN contenu dans les double brin ADN:ARN, qui ressemblent à un cycle de  
30 répllication des virus à ARN, cette réaction permet l'amplification spécifique d'une séquence d'acide nucléique reconnue par deux amorces (une amorce simple et une amorce

contenant le promoteur de la T7 ARN polymérase). Le facteur d'amplification est très important ( $10^9$ ) et la sensibilité très bonne (1 à 10 copies). Les produits obtenus sont pour 90% des ARN simple brin, et pour 10% des ADN double brin.

5                    On réalise les réactions d'amplification à partir de  $10^6$  copies d'ARN 16S de *Mycobacterium tuberculosis*. Cet ARN cible est préalablement obtenu et quantifié selon la méthode suivante: le gène de l'ARN 16S est cloné dans un plasmide, sous le contrôle d'un promoteur. Par transcription in vitro,  
10 on obtient l'ARN 16S. Celui ci est purifié par extraction au phenol-chloroforme, et filtration sur microcon 30 <sup>TM</sup> (Amicon). Il est dosé par son absorption à 260 nm.

                  Les réactions TMA classiques contiennent 4 mM de chacun des rNTP naturels (ATP, CTP, GTP et UTP). Pour  
15 l'incorporation des nucléotides préfonctionnalisés dans les produits d'amplification, la réaction est effectuée en incluant un de ces nucléotides modifiés dans le tampon réactionnel. On étudie la réaction en présence de différents rapports de concentrations entre le nucléotide modifié et le  
20 nucléotide naturel, tout en gardant à 4 mM la concentration totale de chaque nucléotide de la même série, modifié ou naturel. Les rapports étudiés sont 0 %, 10 %, 30 %, 50 % et 70 % (sauf pour l'UTP-fluorescéine, pour lequel on n'a pas pu tester 70 %). On effectue un contrôle négatif, consistant en  
25 une réaction comportant tous les réactifs, dont le plus haut rapport de nucléotides modifiés utilisé (70 ou 50 %), sauf les enzymes (remplacées par le tampon de reprise des enzymes lyophilisées).

                  Les réactions d'amplification sont analysées par  
30 électrophorèse de 5  $\mu$ l de réaction sur gel de polyacrylamide dénaturant (6% acrylamide, 7M urée, 1X TBE, appareil



d'électrophorèse bioRad, 170 volts, 45 minutes) et coloration au bromure d'ethidium, puis par Northern. Les acides nucléiques sont transférés sur membrane (Nylon N, appareil de transfert semi-sec de bioRad, 0,5 X TBE, 25V, 15 minutes) et  
5 hybridés avec des sondes nucléiques spécifiques de *Mycobacterium tuberculosis*:

(séquence : 5'-CGGGATGCATGTCTTGTGGT)

marquées à la peroxydase (préincubation à 37°C durant 30 minutes en PEG, puis incubation à 37°C durant 1 heure en  
10 présence de PEG contenant 0,1 ng/ $\mu$ l de sonde peroxydase). La révélation est colorimétrique (substrat Diaminobenzidine, Sigma).

Pour les réactions contenant le nucléotide fluorescent (UTP-12-fluorescéine), on visualise aussi les  
15 produits d'amplification sur gel avant coloration au bromure d'ethidium par excitation de la fluorescéine sur une table ultraviolet.

Pour toutes les réactions, y compris celles incluant les nucléotides préfonctionnalisés, on visualise après  
20 coloration au bromure d'éthidium les produits d'amplification attendus, en grande quantité. Après Northern, ces produits s'hybrident avec la sonde spécifique.

**EXEMPLE 23 : Analyse des rendements d'incorporation**  
25 **dans les produits d'amplification TMA.**

Pour évaluer la préfonctionnalisation des amplicons obtenus en présence des nucléotides préfonctionnalisés 27a (CTP-(N4)-C<sub>6</sub>O<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>), 27b (CTP-(N4)-C<sub>4</sub>-NH<sub>2</sub>), et à titre de

comparaison, du nucléotide marqué UTP-12-fluorescéine (Boehringer, ref 1 427 857), on détermine le rapport entre le nucléotide préfonctionnalisé incorporé, et le nucléotide naturel analogue.

5 Les produits d'amplification obtenus lors de la réalisation de l'exemple 22 sont séparés des nucléotides en excès dans la réaction par filtration sur Microcon 30 <sup>TM</sup> (de chez Amicon), et repris dans 50  $\mu$ l d'eau. Pour l'amplification en présence d'UTP-12-fluorescéine, la purification est effectuée sur sephadex G50 (absorption de la fluorescéine sur  
10 Microcon).

Ils sont ensuite dosés pour leur absorption à 260 nm (le contrôle sans enzyme doit avoir une concentration très faible).

15 Pour les réactions d'amplification incluant les nucléotides préfonctionnalisés (et leurs contrôles), on procède ensuite à une étape de digestion des acides nucléiques jusqu'au stade nucléoside :

5  $10^{14}$  copies de produits d'amplification (environ 35  $\mu$ g) sont dilués dans un volume final de 86  $\mu$ l d'eau (pour le contrôle sans enzyme, un volume égal au volume d'échantillon le plus important est utilisé). On rajoute 10  $\mu$ l de tampon 10X pour la nucléase P1 (tampon CH<sub>3</sub>COONa pH 5,3, 300mM, 1 mM ZnSO<sub>4</sub>) et 4  $\mu$ l de nucléase P1 (Boehringer, ref 236225, 1 $\mu$ g/ $\mu$ l,  
20 0,3u/ $\mu$ l). La réaction est incubée à 37 °C durant 30 minutes. On ajoute ensuite 12  $\mu$ l de tampon 10X pour la phosphatase alcaline (Boehringer, ref 1246283) et 1  $\mu$ l de phosphatase alcaline (Boehringer, ref 713023, 1U/ $\mu$ l), et l'incubation à 37°C est continuée durant 15 minutes. La réaction est arrêtée  
25 dans la glace.  
30

La composition en nucléosides est alors déterminée par analyse sur chromatographie liquide haute pression (HPLC, Beckman, système Gold), et par comparaison à des standards nucléosides (injection de 50 ng de chaque nucléoside). On injecte 20 µl de la digestion sur colonne C18 (Ultrasphere), chauffée à 45°C. La séparation est effectuée en tampon sodium phosphate 50 mM pH 7, comportant un gradient de méthanol (au bout de 10 minutes, passage en 15 minutes de 0% à 30% de méthanol à 95%). Les pics sont visualisés par absorption à 254 nm, et les aires des pics sont calculées par intégration.

Le rapport entre l'aire du pic du nucléotide préfonctionnalisé, et celui de son analogue naturel permet de déterminer le rendement d'incorporation, c'est à dire le rapport entre la quantité de nucléotide préfonctionnalisé incorporé et la quantité totale de nucléotide de la même série incorporée.

Le contrôle sans enzyme ne doit pas donner lieu à l'apparition de pic. Ce contrôle témoigne de la bonne efficacité de l'étape d'élimination des nucléotides en excès.

Pour les réactions d'amplification incluant l'UTP-fluorescéine, la quantité de nucléotide fluorescéine incorporé est mesurée par l'intensité de fluorescence : la lecture de l'intensité de fluorescence d'une gamme étalon de fluorescéine est effectuée sur un spectrofluorimètre Perkin LS 50. L'intensité de fluorescence des différentes réactions d'amplification est mesurée. Par comparaison avec la courbe d'étalonnage, on détermine la quantité de fluorescéine incorporée. On calcule le rendement d'incorporation par rapport à la concentration en amplicons mesurée par absorption à 260 nm.

L'analyse HPLC permet de séparer les huit nucléosides naturels, ainsi que les trois nucléosides analogues aux trois nucléotides préfonctionnalisés testés.

5 Les résultats, présentés dans le tableau ci-dessous montrent que tous les nucléotides CTP préfonctionnalisés étudiés ont un meilleur rendement d'incorporation dans les produits d'amplification TMA que l'UTP-12-fluorescéine, nucléotide marqué classiquement utilisé.

% [nucl. préfonctionnalisé] / [nucl. naturel]	70	50	30	10	0
27a (CTP-(N4)-C6O2-NH2)/CTP naturel	1/3	1/5	1/9	1/33	0
27b (CTP-(N4)-C4-NH2)/CTP naturel	1/6	1/15	1/48	ND	0
Boehringer, ref 1 427 857 (UTP-12-fluorescéine)/ CTP naturel	ND	1/30	1/45	1/200	0

10 ND : non déterminé. Nucl. : nucléotide

Ces résultats montrent que la préfonctionnalisation du nucléotide CTP permet une meilleure incorporation que le marquage avec une fluorescéine. La très bonne préfonctionnalisation des amplicons permet d'obtenir, après  
15 fonctionnalisation, un marquage plus intense qu'avec le nucléotide fluorescéine.

De même, d'autres fonctions réactives introduites sur la position N4 de la cytidine, telle que la fonction oxyamine du nucléotide 32, permettent un meilleur rendement  
20 d'incorporation.

**EXEMPLE 24: Analyse de l'impact de l'incorporation des nucléotides préfonctionnalisés sur la sensibilité TMA.**

Pour étudier la sensibilité de la TMA incluant  
5 l'incorporation de nucléotides préfonctionnalisés, on a effectué la TMA à partir de quantités décroissantes de cible (ARN 16 S de *Mycobacterium tuberculosis*, décrit dans l'exemple 22) (10 000, 1 000, 100, 10 et 0 copies), en présence de différents rapports entre le nucléotide préfonctionnalisé et  
10 son analogue naturel (100%, 70%, 50% 30% 10% 0%). Les mêmes nucléotides préfonctionnalisés sont testés, 27a (CTP-(N4)-C<sub>6</sub>O<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>), 27b (CTP-(N4)-C<sub>4</sub>-NH<sub>2</sub>).

Les produits réactionnels sont étudiés entre autre par la méthode décrite dans l'exemple 22.

15 Les produits réactionnels sont aussi analysés de façon semi-quantitative par ELOSA (PCT WO 92/19812), et comparaison de l'intensité des signaux avec ceux de gammes étalons.

20 Les réactions effectuées en présence de nucléotide(s) préfonctionnalisé(s) sont analysés par électrophorèse et coloration, Northern, et ELOSA. Les résultats obtenus en ELOSA, qui sont représentatifs des différentes méthodes analytiques utilisées, sont représentés aux figures 4 et 5. Quelque soit le nucléotide  
25 préfonctionnalisé utilisé (27a, 27b) on peut déterminer une concentration en nucléotide(s) préfonctionnalisé(s) telle que la sensibilité de la réaction TMA ne soit pas affectée de manière significative, même avec un très faible nombre de copies de cible initiale. Comme cela ressort plus

spécifiquement de la figure 5 annexée le nucléotide 27b peut remplacer le nucléotide naturel.

**EXEMPLE 25 : Marquage des amplicons**  
5 **préfonctionnalisés :**

Les amplicons préfonctionnalisés obtenus par la méthode utilisée lors de la réalisation de l'exemple 22 , en présence du nucléotide préfonctionnalisé, 27b (CTP-(N4)-C4-NH<sub>2</sub>), sont marqués par une réaction chimique de couplage entre  
10 la fonction nucléophile portée par les amplicons et amenée par les nucléotides préfonctionnalisés incorporés, et une fonction anti-réactive électrophile préalablement couplée à la fluorescéine. Le marquage ainsi obtenu est comparé à celui obtenu en présence du nucléotide marqué UTP-12-fluoresceine  
15 (Boehringer, ref 1 427 857).

Les amplicons sont obtenus par la méthode décrite dans l'exemple 22 à partir de 10<sup>6</sup> copies de cible ARN 16S de *Mycobacterium tuberculosis*, et en présence de 50% de nucléotide préfonctionnalisé 27b.

20 Les amplicons obtenus sont couplés à la fluorescéine-NHS (Boehringer 8370042128), selon la méthode suivante : 30 µl de produits d'amplification TMA sont mélangés avec 30 µl de tampon carbonate 0,2M, NaCl 0,15 M, à pH8,8, et 40 µl (environ 200 équivalents) de fluorescéine NHS (3,5 mg/ml  
25 en DMSO). Après agitation durant une heure à température ambiante, le marquage est analysé.

Les amplicons marqués (15 µl) sont analysés par électrophorèse sur gel comme décrit dans l'exemple 22, et visualisés sous ultraviolet, avant et après coloration au

bromure d'ethidium. Les profils sont comparés avec ceux obtenus par marquage en présence de 50 % d'UTP-12-fluorescéine.

Les signaux obtenus sans coloration sont plus  
5 intenses que ceux obtenus par marquage direct à la  
fluorescéine. En utilisant la fonction oxyamine telle que  
portée par le nucléotide 32, un résultat aussi bon sera  
possible après couplage avec le fluorophore 36. La réactivité  
du couple oxyamine aldéhyde permet des temps de couplage  
10 réduits comme montré dans l'exemple 20.

## REVENDICATIONS

1/ Procédé d'amplification d'une séquence d'un acide nucléique cible, selon lequel :

5           - on dispose au moins : de la séquence d'un acide nucléique cible, d'au moins une amorce oligonucléotidique spécifique de la séquence cible, d'une ou plusieurs activités enzymatiques, de nucléotides,

10           - on amplifie, dans des conditions adaptées notamment à l'activité ou les activités enzymatiques, la séquence cible,

          caractérisé en ce qu'au moins un des nucléotides est un nucléotide préfonctionnalisé, différant des autres nucléotides au moins par la présence d'au moins une fonction réactive de covalence, non protégée, disposée en au moins un  
15 site prédéterminé de la base dudit nucléotide, et en ce qu'on obtient un produit d'amplification préfonctionnalisé comprenant au moins undit nucléotide préfonctionnalisé.

2/ Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'en outre :

20           - on dispose d'un réactif comprenant une fonction anti-réactive de covalence, spécifique de la fonction réactive du nucléotide préfonctionnalisé, et un groupement fonctionnel, et

25           - on fait réagir, directement ou indirectement, le produit d'amplification préfonctionnalisé, avec le réactif, pour obtenir un produit d'amplification fonctionnalisé.

3/ Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que la fonction réactive de covalence du nucléotide préfonctionnalisé est une fonction chimique organique  
30 électrophile ou nucléophile.

4/ Procédé selon la revendication 2 et 3, caractérisé en ce que la fonction anti-réactive du réactif est choisie parmi  
(i) les fonctions chimiques organiques nucléophiles si la fonction réactive de covalence du nucléotide préfonctionnalisé  
35 est une fonction électrophile, et (ii) les fonctions chimiques



organiques électrophiles si la fonction réactive de covalence du nucléotide préfonctionnalisé est une fonction nucléophile.

5/ Procédé selon la revendication 3 ou 4, caractérisé en ce que la fonction chimique organique électrophile est choisie parmi les fonctions aldéhyde, ester activé, acide carboxylique, isothiocyanate, dérivés haloacyles et chlorure de sulfonyle.

6/ Procédé selon la revendication 3 ou 4, caractérisé en ce que la fonction chimique organique nucléophile est choisie parmi les fonctions amine, thiol, oxyamine, alkoxyamine, hydrazine et hydrazide.

7/ Procédé selon la revendication 6, caractérisé en ce que la fonction réactive de covalence est la fonction méthoxyamine.

8/ Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que la fonction réactive de covalence du nucléotide modifié est greffée sur la base par l'intermédiaire d'un bras de couplage.

9/ Procédé selon l'une quelconque des revendications 2 à 8, caractérisé en ce que la fonction anti-réactive de covalence du réactif est greffée sur le groupement fonctionnel par l'intermédiaire d'un bras de couplage.

10/ Procédé selon la revendication 8 et/ou 9, caractérisé en ce que le bras de couplage est choisi parmi les chaînes hydrocarbonées, saturées ou insaturées, éventuellement interrompues par des fonctions amine, amide et oxy.

11/ Procédé selon la revendication 7 ou 9, caractérisé en ce que la fonction anti-réactive de covalence du réactif est la fonction aldéhyde, et cette dernière est liée à un groupement fonctionnel de marquage tel qu'un groupement fluorescent ou luminescent.

12/ Procédé selon les revendications 9 et 11, caractérisé en ce la fonction aldéhyde est liée au groupement fonctionnel par le bras de couplage  $\text{-NH-CS-NH-(CH}_2\text{)}_3\text{-}$  et en ce que le groupement fonctionnel du réactif est la fluorescéine.

13/ Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que le produit d'amplification fonctionnalisé marqué, est détecté qualitativement et/ou quantitativement en phase homogène ou hétérogène.

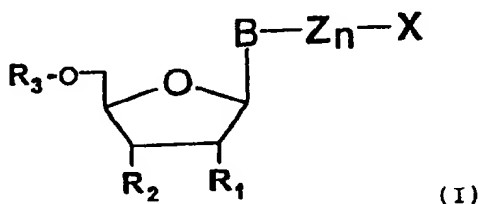
5 14/ Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que la séquence d'acide nucléique cible est une séquence d'ADN ou d'ARN et en ce que les activités enzymatiques comprennent les activités ADN polymérase ARN- et/ou ADN-dépendantes.

10 15/ Procédé selon la revendication 14, caractérisé en ce que les activités enzymatiques comprennent en outre l'activité ribonucléase H et l'activité ARN polymérase ADN-dépendante, et en ce qu'on amplifie selon une suite de réactions de transcription inverse, de transcription et de digestion.

15 16/ Procédé selon la revendication 15, caractérisé en ce que les activités enzymatiques ribonucléase H et ADN polymérase sont apportées par une seule enzyme.

20 17/ Procédé selon la revendication 15, caractérisé en ce que les activités enzymatiques ribonucléase H et ADN polymérase sont apportées chacune par une enzyme différente.

18/ Analogue de nucléotide, préfonctionnalisé susceptible d'être soumis à un traitement enzymatique, répondant à la formule générale (I)



dans laquelle

B représente une base nucléique,

Z représente un bras de couplage,

n est un entier égal à 0 ou 1,

30 X représente une fonction réactive de covalence fixée sur au moins un site de la base nucléique B,

$R^1$  représente H ou OH,

$R^2$  représente H, OH, un groupement mono-, di- ou tri-phosphate ou un groupement protecteur,

$R^3$  représente H, un groupement protecteur, ou un  
5 groupement mono-, di- ou tri-phosphate.

19/ Analogue de nucléotide selon la revendication 18, caractérisé en ce que  $R^1$  et  $R^2$  représentent indépendamment l'un de l'autre chacun H ou OH, et  $R^3$  représente un groupement mono-, di- ou tri-phosphate.

10 20/ Nucléotide préfonctionnalisé susceptible d'être soumis à un traitement enzymatique, dont la base nucléique est dérivée de la cytosine et comporte, au moins sur la fonction aminée en position 4 du cycle pyrimidique, au moins une fonction réactive de covalence nucléophile, non protégée, et  
15 n'influençant pas, de manière significative, le traitement enzymatique dudit nucléotide, caractérisé en ce que la fonction réactive de covalence est choisie parmi les fonctions  $NH_2$ ,  $O-NH_2$ ,  $SH$ , hydrazine et hydrazide.

21/ Nucléotide selon la revendication 20, caractérisé  
20 en ce que la fonction réactive de covalence est liée à ladite fonction aminée en position 4 du cycle pyrimidique par l'intermédiaire d'un bras de couplage choisi parmi  $(-CH_2-)_{n_1}$ ,  $(-O-CH_2-)_{n_1}$  dans lequel  $n_1$  est un entier compris entre 1 et 12 ;  $(-CH_2-O-CH_2-)_{n_2}$ ,  $(-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-)_{n_2}$ ,  $(-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-O-$   
25  $CH_2-CH_2-)_{n_2}$ ,  $(-CH_2-O-CH_2-CH_2-)_{n_2}$ , dans lequel  $n_2$  est un entier compris entre 1 et 6 ; et  $NH-CH_2-O-CH_2-CH_2$ .

22/ Nucléotide selon la revendication 21, caractérisé en ce que le bras de couplage est choisi parmi  $-CH_2-$ ,  $-CH_2-CH_2-$ ,  $-CH_2-CH_2-CH_2-$ ,  $-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-$ ,  $-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-$ ,  $-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-$ ,  $-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-$ , et  $NH-CH_2-O-$   
30  $CH_2-CH_2$ .

23/ Nucléotide préfonctionnalisé susceptible d'être soumis à un traitement enzymatique, dont la base est dérivée de l'uracile et comporte au moins sur la position 5 du cycle  
35 pyrimidique, au moins une fonction réactive de covalence nucléophile, non protégée, et n'influençant pas, de manière

significative, le traitement enzymatique, caractérisé en ce que la fonction réactive de covalence est choisie parmi les fonctions  $\text{-NH}_2$ ,  $\text{-O-NH}_2$ ,  $\text{SH}$ , hydrazine et hydrazide.

24/ Nucléotide selon la revendication 23, caractérisé en ce que la fonction réactive de covalence est liée à la position 5 du cycle pyrimidique par l'intermédiaire d'un bras de couplage choisi parmi  $\text{-C}\equiv\text{C-CH}_2\text{-}$ ,  $\text{-C}\equiv\text{C-CH}_2\text{-NH-CO-CH}_2\text{-}$ ,  $\text{-CH=CH-CH}_2\text{-}$  et  $\text{-CH=CH-CH}_2\text{-NH-CO-CH}_2\text{-}$ .

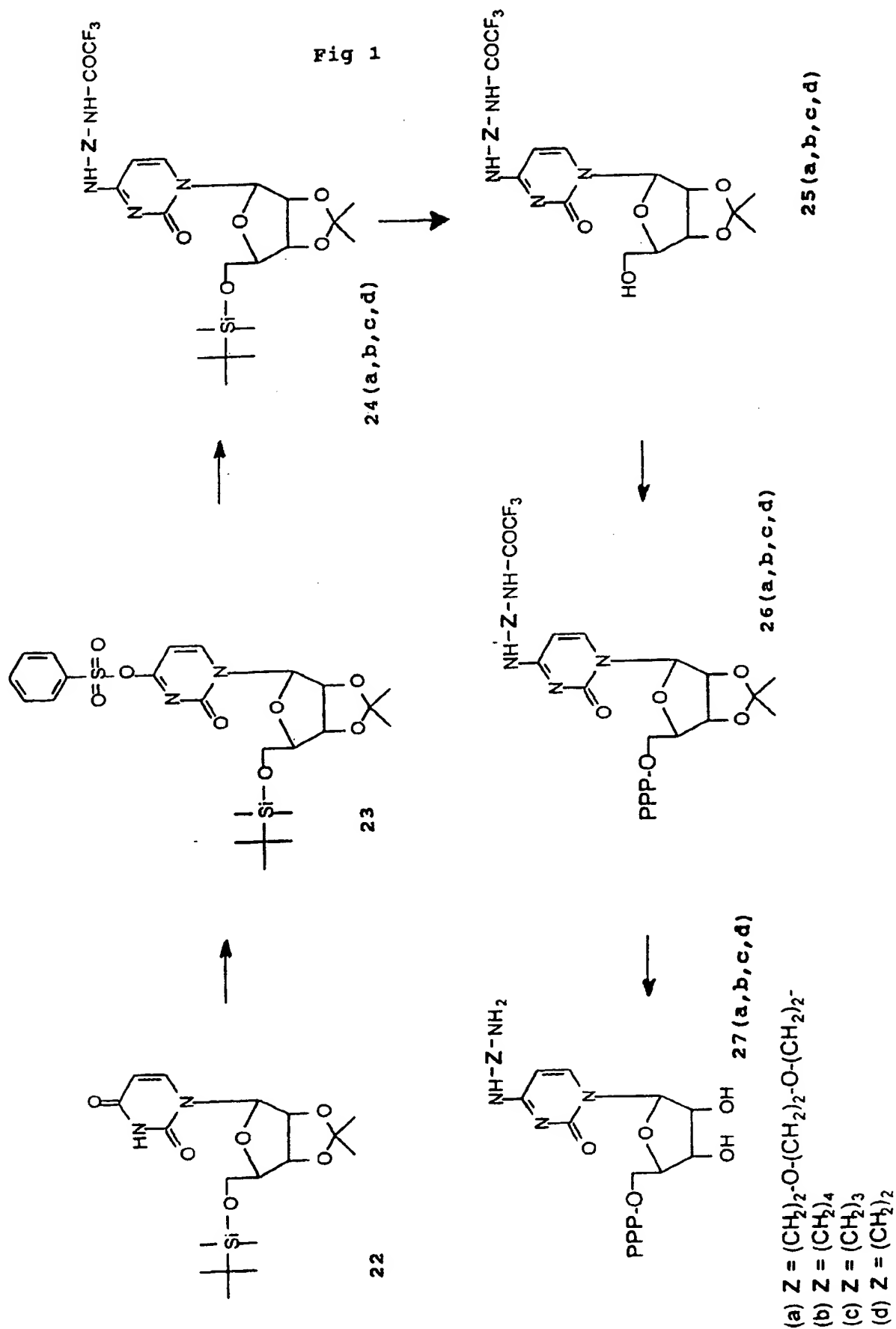
25/ Nucléotide préfonctionnalisé susceptible d'être soumis à un traitement enzymatique, dont la base est dérivée de l'adénine et comporte au moins sur la fonction aminée en position 6 du cycle pyrimidique, au moins une fonction réactive de covalence nucléophile, non protégée, et n'influençant pas, de manière significative, le traitement enzymatique, caractérisé en ce que la fonction réactive de covalence est choisie parmi les fonctions  $\text{NH}_2$ ,  $\text{CH}_2\text{-O-NH}_2$ ,  $\text{SH}$ , hydrazine et hydrazide.

26/ Nucléotide selon la revendication 25, caractérisé en ce que la fonction réactive de covalence est liée à ladite fonction aminée en position 6 du cycle pyrimidique par l'intermédiaire d'un bras de couplage choisi parmi  $(\text{-CH}_2\text{-})_{n_1}$ ,  $(\text{-O-CH}_2\text{-})_{n_1}$  dans lequel  $n_1$  est un entier compris entre 1 et 12 ;  $(\text{-CH}_2\text{-O-CH}_2\text{-})_{n_2}$ ,  $(\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-O-CH}_2\text{-CH}_2\text{-})_{n_2}$ ,  $(\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-O-CH}_2\text{-CH}_2\text{-O-CH}_2\text{-CH}_2\text{-})_{n_2}$ ,  $(\text{-CH}_2\text{-O-CH}_2\text{-CH}_2\text{-})_{n_2}$ , dans lequel  $n_2$  est un entier compris entre 1 et 6 ; et  $\text{NH--CH}_2\text{-O-CH}_2\text{-CH}_2$ .

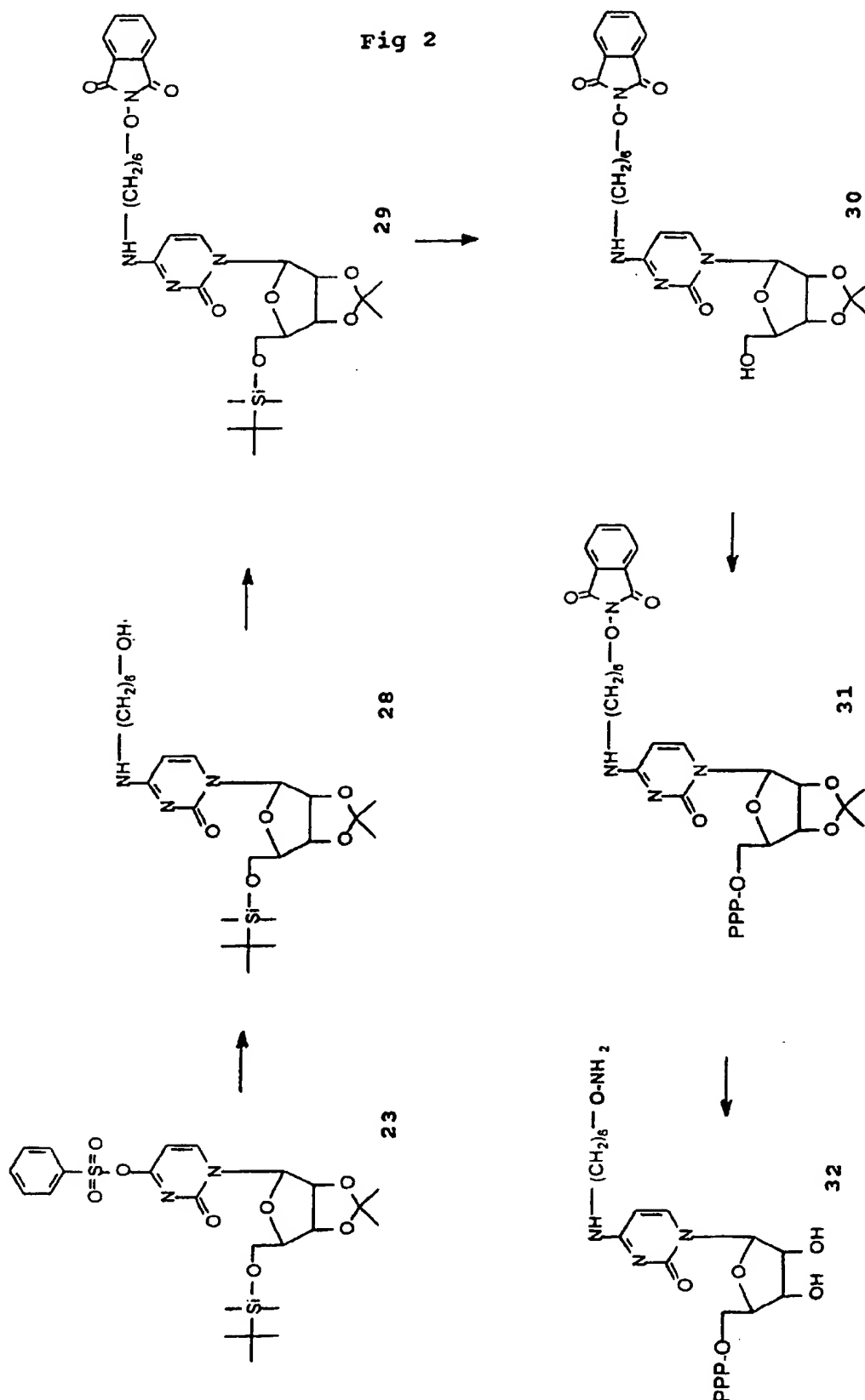
27/ Nucléotide selon la revendication 26, dans lequel le bras de couplage est choisi parmi  $\text{-CH}_2\text{-}$ ,  $\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$ ,  $\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$ ,  $\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$ ,  $\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-O-CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$ ,  $\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-O-CH}_2\text{-CH}_2\text{-O-CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$ , et  $\text{NH--CH}_2\text{-O-CH}_2\text{-CH}_2$ .

28/ Utilisation d'un nucléotide selon l'une quelconque des revendications 12 à 27, dans un traitement enzymatique d'amplification.

Fig 1



**Fig 2**



**Fig 3**

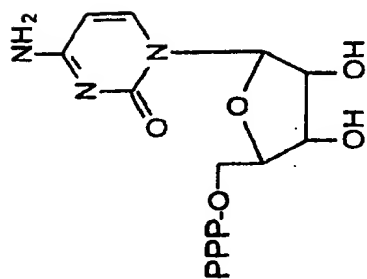
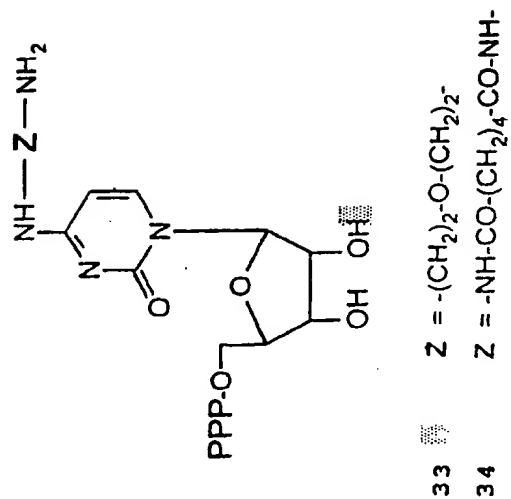
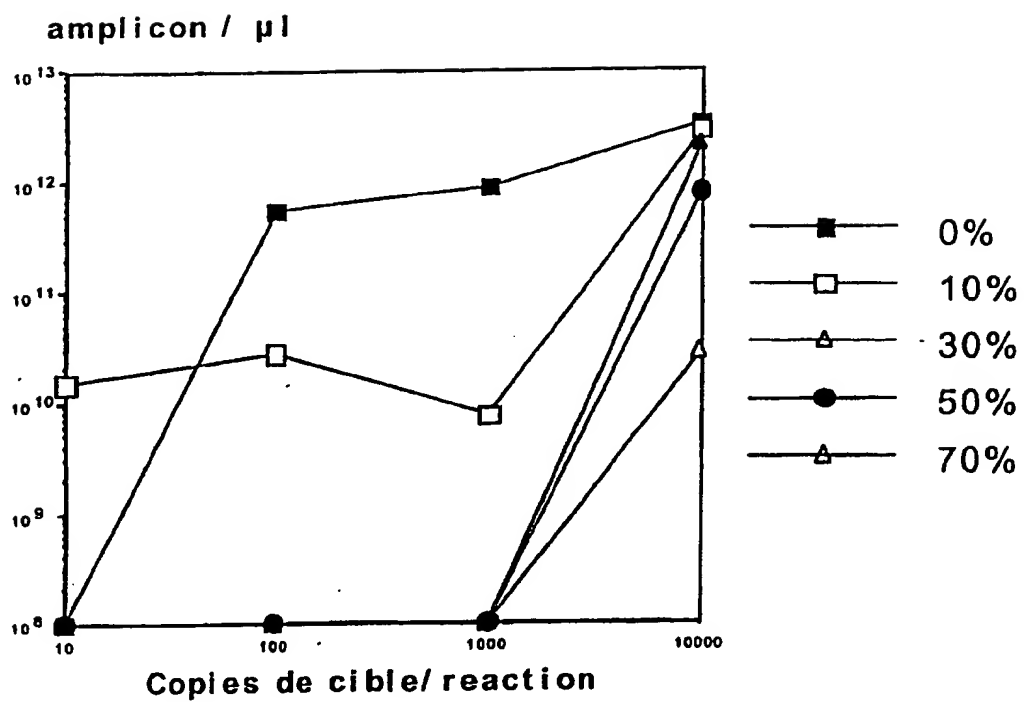


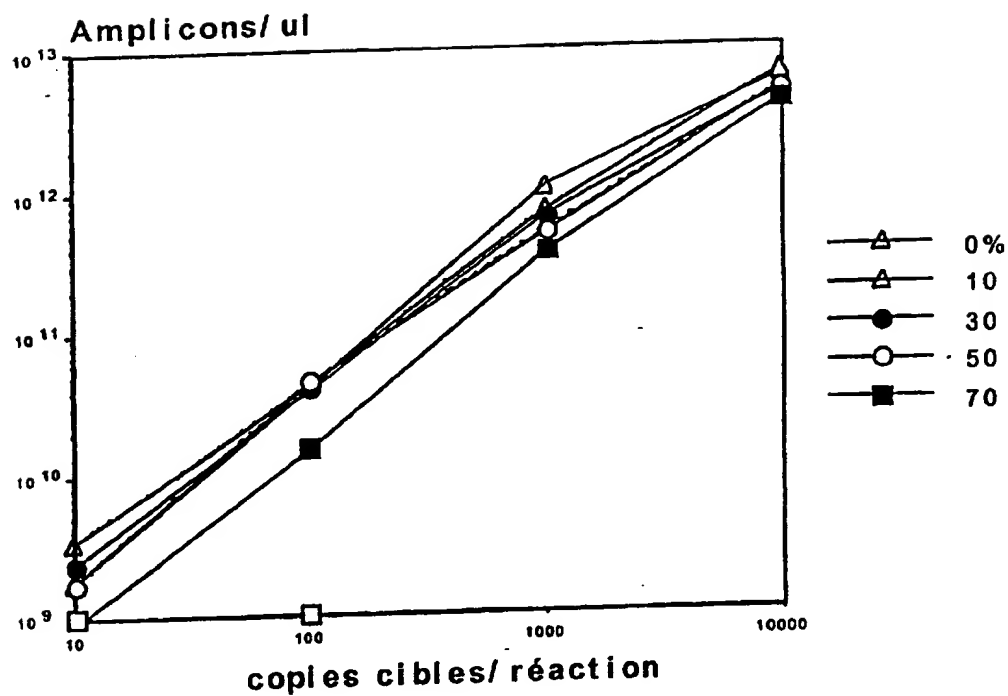
Fig 4





5/5

Fig 5



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inter. Application No  
PCT/FR 97/01445

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
IPC 6 C12N15/10 C12Q1/68 C07H21/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C12N C12Q C07H

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 92 00989 A (ICI PLC) 23 January 1992	1-6, 8-10, 13, 14, 18-28
Y	see abstract see page 1 - page 3, line 9	7, 11, 15-17
Y	see page 4, line 17-19 see page 6, paragraph 3 - page 8, paragraph 2 see page 11, line 16 - page 13 see page 28 - page 30; claims	
Y	WO 92 20822 A (ISIS PHARMACEUTICALS INC) 26 November 1992	7, 11
A	see page 12, line 13-20	12
	-/--	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

### \* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

4 November 1997

Date of mailing of the international search report

25/11/1997

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Macchia, G

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inte. Application No

PCT/FR 97/01445

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	EP 0 682 121 A (TOYO BOSEKI) 15 November 1995 see abstract see page 10, line 10-13 ---	15-17
X	EP 0 212 951 A (INTEGRATED GENETICS INC) 4 March 1987  see page 2 - page 3 see page 9, line 1-11 see page 13, line 3 - page 15, line 16 see page 17, line 12 - page 21 see page 30; claims 10-14 ---	1-6, 8-10,13, 14,18-28
X	EP 0 231 495 A (ENZO BIOCHEM INC) 12 August 1987  see page 11, line 25 - page 13, line 25 see page 17, line 30 - page 22, line 25 see page 23, line 22-35 see page 24, line 22-33 see page 26, line 35 - page 27, line 10 see page 67 - page 71; claims see figure 3 ---	1-6, 8-10,13, 14, 18-20, 23-25,28
A	DE 41 19 075 A (MAX PLANCK GESELLSCHAFT) 17 December 1992 see page 3, line 9-21 -----	12

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Inte. Application No

PCT/FR 97/01445

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9200989 A	23-01-92	NONE	
WO 9220822 A	26-11-92	US 5378825 A	03-01-95
		AU 662538 B	07-09-95
		AU 1998692 A	30-12-92
		AU 666121 B	01-02-96
		AU 2150292 A	30-12-92
		BR 9206026 A	27-12-94
		BR 9206027 A	27-12-94
		CA 2103378 A	22-11-92
		CA 2103464 A	22-11-92
		EP 0586520 A	16-03-94
		EP 0586570 A	16-03-94
		HU 66378 A	28-11-94
		HU 65941 A	29-08-94
		JP 6504067 T	12-05-94
		JP 2625257 B	02-07-97
		JP 6503838 T	28-04-94
		NO 934179 A	12-01-94
		NO 934180 A	11-01-94
		US 5489677 A	06-02-96
		US 5386023 A	31-01-95
		WO 9220823 A	26-11-92
		US 5602240 A	11-02-97
		US 5610289 A	11-03-97
		US 5541307 A	30-07-96
		US 5618704 A	08-04-97
		US 5608046 A	04-03-97
		US 5677437 A	14-10-97
		US 5623070 A	22-04-97
EP 0682121 A	15-11-95	WO 9515399 A	08-06-95
		JP 7203999 A	08-08-95
EP 0212951 A	04-03-87	DE 3689019 D	21-10-93
		DE 3689019 T	05-05-94
		JP 2509574 B	19-06-96
		JP 62039598 A	20-02-87
		US 5155216 A	13-10-92

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Inter: Application No

PCT/FR 97/01445

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0231495 A	12-08-87	CA 1339096 A JP 7322900 A JP 62163699 A	29-07-97 12-12-95 20-07-87
DE 4119075 A	17-12-92	NONE	

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dema: nationale No  
PCT/FR 97/01445

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE  
CIB 6 C12N15/10 C12Q1/68 C07H21/00

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

## B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 6 C12N C12Q C07H

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

## C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	WO 92 00989 A (ICI PLC) 23 janvier 1992	1-6, 8-10, 13, 14, 18-28
Y	voir abrégé voir page 1 - page 3, ligne 9	7, 11, 15-17
	voir page 4, ligne 17-19 voir page 6, alinéa 3 - page 8, alinéa 2 voir page 11, ligne 16 - page 13 voir page 28 - page 30; revendications	
Y	WO 92 20822 A (ISIS PHARMACEUTICALS INC) 26 novembre 1992	7, 11
A	voir page 12, ligne 13-20	12
	-/--	

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

\* Catégories spéciales de documents cités:

"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent

"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date

"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (elle qu'indiquée)

"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens

"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

"A" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

4 novembre 1997

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

25/11/1997

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale  
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.  
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Macchia, G

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dém. internationale No  
PCT/FR 97/01445

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	EP 0 682 121 A (TOYO BOSEKI) 15 novembre 1995 voir abrégé voir page 10, ligne 10-13 ---	15-17
X	EP 0 212 951 A (INTEGRATED GENETICS INC) 4 mars 1987  voir page 2 - page 3 voir page 9, ligne 1-11 voir page 13, ligne 3 - page 15, ligne 16 voir page 17, ligne 12 - page 21 voir page 30; revendications 10-14 ---	1-6, 8-10, 13, 14, 18-28
X	EP 0 231 495 A (ENZO BIOCHEM INC) 12 août 1987  voir page 11, ligne 25 - page 13, ligne 25 voir page 17, ligne 30 - page 22, ligne 25 voir page 23, ligne 22-35 voir page 24, ligne 22-33 voir page 26, ligne 35 - page 27, ligne 10 voir page 67 - page 71: revendications voir figure 3 ---	1-6, 8-10, 13, 14, 18-20, 23-25, 28
A	DE 41 19 075 A (MAX PLANCK GESELLSCHAFT) 17 décembre 1992 voir page 3, ligne 9-21 -----	12

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Dém. : internationale No

PCT/FR 97/01445

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 9200989 A	23-01-92	AUCUN	
WO 9220822 A	26-11-92	US 5378825 A AU 662538 B AU 1998692 A AU 666121 B AU 2150292 A BR 9206026 A BR 9206027 A CA 2103378 A CA 2103464 A EP 0586520 A EP 0586570 A HU 66378 A HU 65941 A JP 6504067 T JP 2625257 B JP 6503838 T NO 934179 A NO 934180 A US 5489677 A US 5386023 A WO 9220823 A US 5602240 A US 5610289 A US 5541307 A US 5618704 A US 5608046 A US 5677437 A US 5623070 A	03-01-95 07-09-95 30-12-92 01-02-96 30-12-92 27-12-94 27-12-94 22-11-92 22-11-92 16-03-94 16-03-94 28-11-94 29-08-94 12-05-94 02-07-97 28-04-94 12-01-94 11-01-94 06-02-96 31-01-95 26-11-92 11-02-97 11-03-97 30-07-96 08-04-97 04-03-97 14-10-97 22-04-97
EP 0682121 A	15-11-95	WO 9515399 A JP 7203999 A	08-06-95 08-08-95
EP 0212951 A	04-03-87	DE 3689019 D DE 3689019 T JP 2509574 B JP 62039598 A US 5155216 A	21-10-93 05-05-94 19-06-96 20-02-87 13-10-92



# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Dém. internationale No

PCT/FR 97/01445

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
EP 0231495 A	12-08-87	CA 1339096 A	29-07-97
		JP 7322900 A	12-12-95
		JP 62163699 A	20-07-87
-----			
DE 4119075 A	17-12-92	AUCUN	
-----			